

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
VINAGRE EM CORTES DE DIANTEIRO BOVINO
EMBALADO A VÁCUO**

FERNANDA DE OLIVEIRA

Bióloga

Dra. LUCIA REGINA DURRANT

Orientador

Dra. WILMA APARECIDA SPINOSA

Co-orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, para
obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

OL14a Oliveira, Fernanda
Avaliação da atividade antimicrobiana do vinagre em cortes de dianteiro bovino embalado a vácuo / Fernanda de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Co-orientador: Wilma Aparecida Spinosa
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Vinagre. 2. Sanitização. 3. Carne bovina. I. Durrant, Lucia Regina. II. Spinosa, Wilma Aparecida. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Evaluation of anti-microbiotic activity of vinegar in cuts of frontal cattle packed on hollow

Palavras-chave em inglês (Keywords): Vinegar, Hygienisation, Cattle meat

Titulação: Mestre em Ciências de Alimentos

Banca examinadora: Lucia Regina Durrant

Fumio Yokoya

Andréa Roberta Clemente

José Luiz Pereira

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lucia Regina Durrant
FEA/UNICAMP
Orientador

Prof. Dr. Fumio Yokoya
FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Andréa Roberta Clemente
FEA/UNICAMP

Prof. Dr. José Luiz Pereira
FEA/UNICAMP

DEDICATÓRIA

*A DEUS por estar aqui!
Aos meus pais e às minhas irmãs
por todo amor que demonstraram!!!
Obrigada por serem meu exemplo de vida,
por me amarem e por acreditarem em mim!!!*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Wilma Spinosa meu eterno reconhecimento pela orientação, paciência, amizade, apoio, carinho e respeito durante todo este período de convivência.

À Elaine, pela valiosa amizade, orientação e colaboração nas análises microbiológicas e análise estatística;

Ao Vitório, pela ajuda, paciência e incentivo;

À Profa. Dra. Lucia Regina Durrant pela orientação, confiança e tolerância;

À Sueli pela colaboração nas análises microbiológicas;

Às minhas amigas, Luciana e Aline, pela amizade, conselhos e carinho;

À Profa. Má pela boa vontade de fazer o Abstract;

Aos professores doutores Rubens Cruz e Pedro Oliva Neto, pelo incentivo desde sempre;

Ao Abatedouro Beira Rio, em especial, ao Fernando pela atenção e condições de trabalho sempre acolhedoras;

À Empresa Vinagre Saboroso pela doação do vinagre utilizado nos experimentos;

À Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA, pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos membros da banca pelas sugestões;

À todos os colegas do CEPECI – FEMA pelo convívio agradável, amizade e ajuda.

À todos que colaboraram indiretamente no desenvolvimento deste trabalho!!!!

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Microbiota da carne	5
2.2 Métodos de amostragem:.....	11
2.3 Ácidos orgânicos.....	13
2.4 Efeito dos ácidos orgânicos na extensão da vida de prateleira de carnes.....	18
2.5 Outras aplicações do ácido acético.....	24
3. MATERIAL & MÉTODOS.....	28
3.1 Vinagre.....	28
3.2 Carne bovina.....	28
3.3 Meios de cultura.....	28
3.4 Metodologia experimental	30
3.4.1 Preparo da amostra.....	30
3.4.2 Isolamento dos microrganismos.....	30
3.4.3 Análises microbiológicas.....	30
3.4.4 Purificação dos isolados.....	32
3.4.4.1 Identificação macroscópica dos isolados.....	32
3.4.4.2 Técnica de Coloração de Gram.....	33
3.4.4.3 Testes Catalase e Oxidase.....	33
3.4.4.4 Manutenção das colônias isoladas.....	33
3.4.5 Detecção da atividade antimicrobiana do vinagre.....	34
3.4.5.1 Preparo do inóculo.....	34

3.4.5.2 Técnica de Difusão em Poço.....	34
3.4.5.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	35
3.4.6 Aplicação do vinagre nos cortes <i>in natura</i>	36
3.4.6.1 Avaliação microbiológica.....	38
3.4.7 Análise Estatística.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Características morfológicas dos isolados.....	39
4.2 Técnica de Coloração de Gram.....	40
4.3 Testes Catalase e Oxidase.....	41
4.4 Detecção da atividade antimicrobiana do vinagre.....	42
4.5 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	44
4.6 Evolução da microbiota na carne bovina durante o armazenamento	48
4.7 Análise dos atributos da carne.....	64
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a	Desossa das carcaças e separação dos cortes de dianteiro bovino.....	36
Figura 1b	Detalhes da desossa das carcaças.....	36
Figura 2a	Câmara de refrigeração onde foram acondicionados os cortes de dianteiro bovino embalados a vácuo utilizados nos experimentos.....	37
Figura 2b	Prateleiras da câmara de refrigeração onde foram armazenadas as caixas contendo os cortes de dianteiro embalados a vácuo.....	37
Figura 3a	Halos de inibição do isolado 2 do meio PCA.....	43
Figura 3b	Halos de inibição do isolado 2 do meio ABG.....	43
Figura 4a	Teste de CMI com linhagem AP I4.....	46
Figura 4b	Teste de CMI com linhagem MRS I1.....	46
Figura 5a	Teste de CMI na linhagem ABG I2.....	47
Figura 5b	Teste de CMI na linhagem PCA I2.....	47
Figura 6	Gráfico da contagem das bactérias aeróbias mesófilas nas amostras em 45 dias de armazenamento.....	52
Figura 7	Gráfico da contagem das bactérias psicrotróficas nas amostras tratadas com vinagre A1 e A2 e no controle durante o período de armazenamento.....	53
Figura 8	Gráfico da contagem de <i>Pseudomonas</i> sp. nas amostras A1, A2 e controle durante 45 dias de armazenamento.....	54
Figura 9	Gráfico da contagem de bactérias lácticas nas amostras durante 45 dias de armazenamento.....	56
Figura 10	Gráfico da contagem de bolores nas amostras durante 45 dias de armazenamento.....	57
Figura 11	Gráfico da contagem de leveduras nas amostras durante o período de armazenamento.....	58
Figura 12	Gráfico do NMP de coliformes totais nas amostras durante 45 dias de armazenamento.....	60

Figura 13	Gráfico do NMP de coliformes fecais nas amostras durante 45 dias de armazenamento.....	61
Figura 14	Cortes de dianteiro tratados com vinagre (A2) e sem tratamento (C) com 20 dias de armazenamento.....	64
Figura 15	Cortes de dianteiro tratados com vinagre (A2) e sem tratamento (C) embalados a vácuo com 20 dias de armazenamento.....	65
Figura 16	Cortes de dianteiro tratados com vinagre (A2) e sem tratamento (C) embalados a vácuo com 30 dias de armazenamento.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos de Amostragem.....	12
Tabela 2	Meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos.....	29
Tabela 3	Formulação do meio AP (g/L; pH 6.5-6.8).....	29
Tabela 4	Características Macroscópicas das colônias microbianas.....	33
Tabela 5	Volumes utilizados nos testes preliminares de CMI.....	35
Tabela 6	Volumes utilizados nos testes de CMI.....	35
Tabela 7	Identificação Macroscópica das colônias isoladas a partir do meio PCA.....	39
Tabela 8	Identificação Macroscópica das colônias isoladas a partir do meio AP.....	39
Tabela 9	Identificação Macroscópica das colônias isoladas a partir do meio MRS.....	40
Tabela 10	Identificação Macroscópica das colônias isoladas a partir do meio ABG.....	40
Tabela 11	Resultados obtidos no Teste de Coloração de Gram.....	41
Tabela 12	Resultados obtidos no Teste Catalase.....	41
Tabela 13	Resultados obtidos no Teste Oxidase.....	42
Tabela 14	Halos de inibição das diferentes linhagens nas concentrações 2.1% (p/v), 4.2% (p/v) e 6.3% (p/v) de acidez.....	44
Tabela 15	CMI das diferentes concentrações do vinagre aplicada nos isolados.....	45
Tabela 16	Contagens microbianas em cortes de dianteiro submetidos aos tratamentos (A1 e A2) e não tratado (C) nos tempos 0 e 20 horas e 20, 30, 37 e 45 dias após o abate.....	49

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do vinagre na concentração de 2,4% de acidez, que foi determinada a partir do teste de concentração mínima inibitória (CMI), sobre a microbiota presente em cortes de dianteiro bovino, embalados a vácuo. Foram avaliados cortes de dianteiro provenientes de 14 carcaças bovinas, machos ou fêmeas, Sem Raça Definida (SRD), com idade aproximada de 24 meses, provenientes do abatedouro, localizado no interior do estado de São Paulo. Após o abate, as carcaças utilizadas nos experimentos foram mantidas em câmara fria, $0\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante, aproximadamente, 24 horas, em seguida desossadas e embaladas a vácuo. Avaliou duas formas de aplicação: aspersão do vinagre na carcaça logo após o abate (Tratamento A1) e aspersão do vinagre nos cortes de dianteiro desossados (Tratamento A2). Após os tratamentos, os cortes de dianteiro desossados e embalados a vácuo foram armazenados em câmara fria a temperatura de $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 45 dias. Foram realizadas análises microbiológicas de contagem padrão em placas de bactérias mesófilas aeróbias, psicrotróficas, *Pseudomonas*, bactérias lácticas, contagem de bolores e leveduras e de coliformes totais e fecais, nos tempos 0 e 20 horas, 20, 30, 37 e 45 dias após o abate. O tratamento com vinagre seguido de embalagem a vácuo e temperatura de armazenamento de $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ inibe o crescimento de bactérias mesófilas, psicrotróficas, *Pseudomonas* e de bolores e leveduras por 20 dias e o de bactérias do grupo coliformes por 45 dias de armazenamento, nos cortes de dianteiro bovino. O tratamento A2 foi mais eficiente que o tratamento A1 em relação ao menor número de bactérias lácticas, bolores e leveduras até 20 dias de armazenamento. A vida-de-prateleira dos cortes de dianteiro bovino, com o tratamento A1 e controle (C), foi menor que 20 dias e as contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas atingiram valores próximos de 10^7 UFC/g. As contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas no tratamento A2 foram menores que 2 ciclos logarítmicos em relação ao controle (C) durante 37 dias de armazenamento.

Palavras-chave: vinagre; sanitização; carne bovina.

ABSTRACT

The objective of this work was to verify the effect of vinegar in the concentration of 2,4% of acidity, which was determined from the test of inhibitory minimal concentration (IMC), about the microbiotic presents in cuts of frontal cattle, packed on hollow. It was analyzed frontal cuts from 14 bovine carcasses, males or females, Without Defined Race (WDR), about 24 month-age, deriving from slaughterhouse, placed in the countryside of Sao Paulo State. After the slaughter, the carcasses used in our experiments were kept into ice room, $0\pm 2^{\circ}\text{C}$, during about 24 hours, and then they were boned and packed on hollow. We analyzed two forms of treatment: aspersion of vinegar in the carcass right after the slaughter (Treatment A1) and aspersion of vinegar in the cuts of boned frontal (Treatment A2). After both treatments, the frontal cuts boned and packed on hollow were kept into the ice room, $5\pm 2^{\circ}\text{C}$, during 45 days. We did microbiological analyses of standard counting in plates of aerobics mesophylic bacteria, psychrotrophic, *Pseudomonas*, lactic bacteria and counting of moulds and leaven and of total and fecal coliform, at 0 and 20 hours, 20, 30, 37 and 45 days after the slaughter. The treatment of vinegar followed by packed on hollow and kept on a temperature $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ inhibits the growing of mesophylic bacteria, psychrotrophic, *Pseudomonas*, and of moulds and leaven during 20 days and inhibits the growing of coliform in cattle frontal cuts during 45 days stored. The treatment A2 was more efficient than the treatment A1 when compared to the smaller number of lactic bacteria, moulds and leaven until 20 days of storage. The frontal killing cattle shelf-life, with treatment A and control (C), was smaller than 20 days and the counting of mesophilic bacteria, psychrotrophic, reached values near 10^7 UFC/g. The counting of mesophilic bacteria, psychrotrophic, in treatment A2 was smaller than two cycles logarithms related to control (C) during 37 days of storage.

Key-words: vinegar; hygienisation; cattle meat.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte no Brasil é uma das atividades mais importantes do agronegócio brasileiro. A partir dos anos 90 o Brasil, optou por se inserir na economia global, não só abrindo seus mercados, mas também reestruturando os diversos setores produtivos de sua economia, buscando torná-los mais competitivos no comércio internacional. Na bovinocultura de corte, uma das prioridades passou a ser o controle e a erradicação da febre aftosa, condição imprescindível para se alcançarem novos mercados (LIMA *et al.*, 2005).

No ano de 2004, o Brasil apresentou o maior rebanho bovino do mundo, com, aproximadamente, 170 milhões de cabeças. Segundo dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC), nos cinco primeiros meses do ano de 2004, as vendas externas somaram US\$ 866,8 milhões, um salto de 68,5% frente aos US\$ 532 milhões obtidos no mesmo período de 2003 (PRADO *et al.*, 2004).

As exportações brasileiras de carne bovina *in natura* em 2004 superaram US\$ 2 bilhões, o que deu ao Brasil o título de maior exportador mundial superando as vendas externas dos Estados Unidos, Austrália e Argentina (LIMA *et al.*, 2005).

As exportações de carne bovina nos primeiros sete meses de 2005 somaram US\$ 1,752 bilhão, contra um total de US\$ 1,313 bilhão no mesmo período do ano anterior. Em volume, foi vendido ao exterior 1,299 milhão de toneladas, número 35% superior a 965 mil toneladas dos primeiros sete meses em 2004 (REVISTA NACIONAL DA CARNE, 2005).

Doença da vaca louca, influenza aviária, febre suína clássica e febre aftosa são exemplos de doenças que motivam a aplicação de medidas sanitárias. A febre aftosa é um grande desafio para o Brasil quando se observa que barreiras comerciais restringem as exportações de carne bovina e suína, e impedem o acesso do produto brasileiro a novos mercados.

O fato de o Brasil não ser considerado um país livre da febre aftosa dificulta a exportação de carne bovina *in natura* para importantes mercados como os Estados Unidos, Japão, Coréia do Sul, Canadá e China (LIMA *et al.*, 2005).

O Brasil deixou de vender carnes *in natura* para mercados que em 2004 compraram aproximadamente US\$ 7,5 bilhões em carne bovina e US\$ 7 bilhões em carne suína, tendo em vista restrições causadas pela febre aftosa (LIMA *et al.*, 2005).

A carne e produtos derivados são extremamente perecíveis, portanto devem ser tomados cuidados especiais durante a sua manipulação, processamento e armazenamento. A carne é um alimento rico em nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano, portanto, pode deteriorar-se em um curto espaço de tempo, alterando suas características organolépticas (SILVA *et al.*, 2001).

As qualidades nutritivas, a atividade de água ($A_w > 0,95$, em carne fresca) e o pH próximo da neutralidade tornam a carne um meio ideal para o desenvolvimento microbiano. O crescimento microbiano e as alterações provocadas na carne dependem de uma série de fatores: tipo e número de microrganismos presentes na carne, temperatura e ambiente de armazenamento (SAUCIER, 1999).

A carne fresca apresenta pH geralmente entre 5,5 e 6,0, ou seja, longe da faixa ótima para o efeito da não-dissociação do ácido orgânico e, ainda, um alto teor de

proteínas, entre 18–22%, o que exerce um efeito tamponante sobre o meio (XAVIER, 1997).

A vida-de-prateleira da carne in natura depende, principalmente, da contaminação da carcaça durante o processo de abate. O tipo e o número de microrganismos presentes na carne refletem o grau de sanitização do abatedouro, e das condições de armazenamento após o abate dos animais (ALI *et al.*, 1982).

O aumento da vida-de-prateleira da carne resfriada deve-se à redução da contaminação pela microbiota presente na parte externa. A maioria dos microrganismos que alteram a carne fresca é bactérias aeróbias mesófilas, sendo algumas causadoras de toxinfecções alimentares (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

A contaminação bacteriana da carne é atualmente uma das maiores preocupações das autoridades sanitárias no nosso país. A falta de uma padronização das medidas de higiene, desde o abate até a chegada ao consumidor final, é a principal causa deste problema.

Nos últimos 25 anos, a utilização de agentes químicos na sanitização de carcaças de animais recém-abatidos, destinados ao consumo humano, tem sido estudada visando à sanidade e a vida-de-prateleira da carne (SILVA, 1999a).

Alguns agentes de sanitização, como os ácidos orgânicos, podem eliminar microrganismos em superfícies de alimentos sólidos como a carne (SILVA, 1995). A aplicação de ácidos orgânicos na superfície de carne tem sido empregada na redução de populações de bactérias, e assim estender a vida-de-prateleira e minimizar o risco de doenças transmitidas por alimentos, sem afetar a qualidade sensorial da carne (DELMORE *et al.*, 1998, citado por SILVA, 1999b).

A sanitização das carcaças não deve ser utilizada como forma de mascarar as falhas higiênicas que podem ocorrer durante a criação e o abate dos animais, como também no processamento das carcaças. Portanto, ela pode ser utilizada em complementação às boas práticas de produção animal, visando reduzir ainda mais a presença de microrganismos patogênicos na carne (TECNOLOGIA, 1998).

As funções dos ácidos orgânicos são variadas e amplas, nem todas relacionadas à sanitização da carne, podendo ser usados na preservação de grãos, rações, nutrição, assepcia, limpeza e desinfecção, desodorizante de ambientes, antisséptico e cicatrizante, entre outras.

Segundo ADAMS (1999), os ácidos orgânicos produzem acidez, a qual por sua vez age como flavorizante e também retarda a degradação enzimática. Atuam como agentes quelantes que se ligam aos metais formando os quelatos metálicos, os quais previnem ou reduzem a oxidação oriunda da catálise dos metais-íons. Agem diretamente como fortes inibidores do crescimento microbiano, podendo ter uso na preservação de grãos e rações, sanitização da carne e como aditivo promotor de crescimento na ração.

O ácido acético e seus sais são bastante eficientes e largamente usados como acidulantes e conservantes em alimentos. Sua ação conservadora é atribuída à queda de pH provocada no meio, sua atividade antimicrobiana inicia-se em concentrações superiores a 0,5% (PARDI *et al.*, 1994).

O vinagre e o limão são conhecidos como conservantes de alimentos, em função de seu alto conteúdo de ácidos orgânicos com ação antimicrobiana. O vinagre contém ácido acético em uma concentração mínima de 4% e já é bastante utilizado na desinfecção de frutas e verduras em nível doméstico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microbiota da carne

Segundo PRUDENCIO *et al.* (1985) a saúde pública e o aspecto econômico são os fatores principais que justificam a avaliação microbiológica dos alimentos.

1. Saúde pública: muitos alimentos são veículos ou substratos para o transporte ou proliferação de microrganismos patogênicos;
2. Aspecto econômico: a proliferação de microrganismos contaminantes resulta em alteração ou deterioração dos alimentos.

As alterações microbianas da carne devem-se a fatores intrínsecos do próprio alimento, ou seja, os de fatores físico, químico e bioquímico, e aos extrínsecos, quais sejam, os fatores do meio ambiente, e as outras condições que podem estar presentes (XAVIER, 1997).

Na determinação de aceitabilidade da carne como alimento, um fator de destaque é a condição microbiológica inicial, de modo que exista uma relação direta entre o número inicial de microrganismos e o tempo de vida útil destes produtos (PRUDENCIO *et al.*, 1985).

A contaminação bacteriana de carnes resfriadas tem sido descrita desde 1880 (BAXTER & ILLSTON, 1976). Dois grupos de microrganismos estão relacionados com a qualidade da carne: os causadores de intoxicações e infecções e os deteriorantes. As bactérias estão intimamente relacionadas ao processo de deterioração, infecção e intoxicação (ROÇA & SERRANO, 1993).

A vida-de-prateleira da carne fresca pode ser determinada pelo número e tipo de contaminantes microbiológicos e também pela temperatura de estocagem das carcaças após o abate dos animais (VARNAM & SUTHERLAND, 1995).

A vida útil das carnes resfriadas é realçada por vários fatores que afetam a velocidade de crescimento dos psicrotróficos: superfície seca das carcaças, baixo nível inicial de contaminação, temperatura e limitação de oxigênio (BARRA & PANETTA, 1980).

A maioria dos microrganismos que alteram a carne fresca é bactérias aeróbias mesófilas e algumas delas são causadoras de toxinfecções alimentares. Os principais deterioradores da carne são os Gram negativos: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* e *Moraxella*, e os Gram positivos *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Micrococcus* e *Streptococcus* (JAY, 1992). Entre as causadoras de toxinfecções alimentares podem ser incluídas *Salmonella* sp., *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (TECNOLOGIA, 1998).

A deterioração fúngica é causada principalmente por *Penicillium*, *Cladosporium*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Rhizopus*, etc. As principais leveduras psicrotróficas da deterioração pertencem aos gêneros *Candida*, *Torulopsis*, *Monilia*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* (BARRA & PANETTA, 1980).

A maioria das espécies deteriorativas utiliza preferencialmente a glicose como fonte de energia. Quando as bactérias não obtêm mais glicose suficiente, elas começam a degradar aminoácidos, gerando odores de amônia, entre outros (NETO, 2004).

As bactérias Gram negativas como *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Alcaligenes* e *Aeromonas* utilizam aminoácidos simples e compostos nitrogenados como fonte de energia quando se esgota a fonte de carboidratos. Os produtos de seu metabolismo, portanto, são compostos como amônia, aminas, indol e gás sulfídrico, de odor extremamente desagradável e facilmente notado pelo consumidor (JAY & SHELEF, 1978).

A flora normalmente encontrada na carne em condições aeróbicas é formada por *Pseudomonas* (GILL & NEWTON, 1978). Em um ambiente aeróbio, a degradação microbiana de carne bovina resfriada, produz uma gradual elevação no pH devido a liberação de amônia após um ataque microbiano nos aminoácidos. A deterioração aeróbia se torna evidente quando as bactérias estão ainda na fase logarítmica de crescimento, antes que haja qualquer degradação de moléculas complexas presentes na carne (NETO, 2004).

Em condições de anaerobiose, cepas anaeróbias ou anaeróbias facultativas tais como *Lactobacillus*, *Brochothrix thermosphacta* e *Enterobacteriaceae* constituem a flora microbiana dominante. Entretanto, em muitos casos, bactérias ácido-láticas se tornam dominantes em embalagens a vácuo de carne bovina sob refrigeração (NETO, 2004).

A temperatura é o fator externo que mais afeta o crescimento dos microrganismos. As bactérias psicotróficas são de muita relevância em carnes, uma vez que elas são os principais deterioradores (XAVIER, 1997).

Durante o resfriamento da carcaça podem ocorrer variações na microbiota contaminante. Há predominância inicial de bactérias mesófilas, invertendo-se para psicotróficas durante a estocagem sob refrigeração (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Segundo STOKES & REDMOND (1975), 93% da microbiota presente em carnes é constituída de psicrófilos e psicrotróficos, com predominância de bastonetes móveis Gram negativos.

A flora que se desenvolve na superfície da carne bovina, sob temperatura de refrigeração, inclui as seguintes bactérias psicrotróficas: *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Lactobacillus* sp., *Micrococcus* sp. e *Microbacterium* sp. (SMITH *et al.*, 1975).

De acordo com ROÇA & SERRANO (1993), a contaminação tissular profunda pode ocorrer de três formas: invasão ante-mortem a partir de lesões no animal; invasão no momento do abate, que pode ocorrer através de instrumentos utilizados no atordoamento e na sangria; e invasão post-mortem, relacionada, principalmente, à interrupção do abate, quando o animal não é esfolado ou eviscerado após a sangria.

O fator mais importante para controlar o grau de contaminação da carne fresca é sem dúvida a higienização dos locais de abate e de manipulação e sanitização da superfície das carcaças. A sanitização da carcaça pode ser incluída como operação de rotina no processo de abate de animais para consumo humano, no sentido de eliminar, ou pelo menos reduzir, a incidência desses contaminantes (SILVA, 1999a).

A maior parte da microbiota da carne *in natura* encontra-se em sua superfície e a qualidade microbiológica depende das condições em que os animais foram criados, abatidos (principalmente, esfolagem e evisceração) e processados (VARNAM & SUTHERLAND, 1995).

As bactérias podem multiplicar-se na superfície dos equipamentos utilizados durante a evisceração e disseminar-se pela carcaça. A disseminação continua nas operações de esfolagem, retalhamento e desossa (VARNAM & SUTHERLAND, 1995).

Segundo GRAU (1986), no momento do abate, o rúmen e as fezes podem conter microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, *E. Coli* e *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*. As fezes também podem apresentar contagem de *Clostridium perfringes*.

A evisceração pode causar excessiva contaminação da carcaça com o conteúdo intestinal do animal (VARNAM & SUTHERLAND, 1995). A evisceração deve ser conduzida cuidadosamente com o objetivo de minimizar a contaminação da carcaça, evitando-se perfurações no trato gastrointestinal (ROÇA & SERRANO, 1993).

Uma das fontes potenciais de contaminação bacteriana na indústria de carne é o ar atmosférico. Logo após a remoção da pele, as carcaças estão sujeitas a essa contaminação, devido à deposição na carcaça de microrganismos da atmosfera das salas de matança, de resfriamento, armazenamento, desossa e comercialização (ROÇA & SERRANO, 1993).

Entre os principais grupos de microrganismos presentes no ar atmosférico em nível de matadouro-frigorífico encontram-se os micrococcos, coliformes, bacilos e estafilococos (BARRAT *et al.*, 1983).

A quantificação de bactérias psicrotróficas presentes num alimento informa sobre o potencial de deterioração para armazenamento prolongado. A velocidade de deterioração diminui com a diminuição da temperatura e, normalmente, são destruídas com tratamento térmico suave (FRANCO, 1996).

O início da deterioração da carne pode ser caracterizado pela descoloração da superfície, quando as contagens microbianas estão na faixa de 10^6 UFC/g e é sucedida por odores estranhos (10^7 a 10^8 UFC/g). As alterações indesejáveis de sabor requerem níveis de 10^8 a 10^9 UFC/g e o máximo de contagem (10^9 UFC/g) aparecem na forma de limo (ROÇA & SERRANO, 1993).

No processo de deterioração da carne de frango, os odores indesejáveis são percebidos antes do aparecimento de limosidade, podendo ser detectados geralmente quando as contagens se encontram acima de 10^7 UFC/g (INGRAM & DAINITY, 1971).

A deterioração da carne e produtos cárneos, ocasionada pela proliferação de microrganismos produtores de ácidos e odores desagradáveis resultantes de sua ação proteolítica, também alteram a cor e a textura desses produtos, tendo grande importância no aspecto econômico e da segurança alimentar (PRUDENCIO *et al.*, 1985).

A variação das contagens microbianas ao longo da linha de abate depende da adesão ou fixação de microrganismos na superfície da carne, que pode ser dividida em três fases: a) adsorção ou imobilização dos organismos na superfície devido à força de Van der Waals; b) consolidação do microrganismo na superfície, aumentando a força de adesão pela formação de pontes de polissacarídeos (dextrana e ácido lipoteicoico); c) colonização ou crescimento e distribuição dos organismos na superfície (NOTERMANS & KAMPELMACHER, 1983).

Segundo FLISS *et al.* (1991), vários fatores afetam a adesão da bactéria na superfície da carcaça, principalmente o gênero da bactéria, temperatura do ambiente, substratos presentes na carne e das características físico-químicas da carcaça, como pH e capacidade de retenção de água. Outro fator que influi nas contagens é o método de amostragem, como corte superficial, utilização de *swabs*, enxaguamento, scraping (raspagem) e o uso de substâncias sólidas captadoras de bactérias (placas Rodac, ágar salsicha artificial e ágar seringa).

2.2 Métodos de amostragem

A avaliação microbiológica constitui um dos parâmetros mais importantes para se determinar a qualidade e a sanidade dos alimentos, e é igualmente importante para verificar se padrões e especificações microbiológicas nacionais e internacionais estão sendo atendidas adequadamente (SILVA, 1999a).

Há dois tipos de métodos microbiológicos, os destrutivos e os não destrutivos. Nos métodos destrutivos, as amostras, padronizadas pelo peso e/ou tamanho, são cortadas e maceradas em um diluente estéril e em seguida convenientemente plaqueadas em meios de cultura, para a enumeração das colônias. Nos métodos não destrutivos, uma área padronizada é delimitada por um gabarito e em seguida os microrganismos são coletados por arraste utilizando-se zaragatoa ou *swab*, que são agitados em um diluente estéril, para a liberação da microbiota coletada. A suspensão resultante dessa operação é diluída e plaqueada, para a quantificação dos microrganismos contaminantes (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

Existem vários métodos de avaliação microbiológica da superfície da carne e dos produtos cárneos, podendo ser destacados a incisão do tecido, zaragatoa, análise da água de enxágüe, ágar contato direto, raspagem da superfície, fita adesiva, remoção de microrganismos por meio de vácuo, dispersão da luz, avaliação por bioluminescência e combinação de dois ou mais métodos (Tabela 1).

A Tabela 1 mostra diferentes métodos de amostragem utilizados em trabalhos relacionados com avaliação microbiológica da superfície da carne e dos produtos cárneos.

Tabela 1. Métodos de amostragem

Preparo da amostra	Referências
50 g da amostra triturada em 450 mL de solução Peptonada 0,1%.	SILVA (1995)
Área de 10 cm ² , zaragatoa (<i>swabs</i>) diluída em 25 mL de solução Peptonada 0,1%.	SILVA & BERAQUET (1996)
Área de 10 cm ² macerada em 10 mL de solução Peptonada 0,1%.	XAVIER (1997)
25 g da amostra triturada em 225mL de solução Peptonada 0,1%.	SILVA <i>et al.</i> (2001)
Técnica de Enxaguadura: 100 g da amostra com espessura de 0,5 cm diluída em 110 mL água peptonada 0,1%.	SOCCOL (2002)
Área de 10 cm ² , <i>swabs</i> estéreis diluídos em 10 mL de solução Peptonada 0,1%.	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2003)

FLISS *et al.* (1990), compararam a eficiência de três diferentes técnicas de amostragem para a análise da superfície de carcaças: ágar contato direto, incisão de tecido e zaragatoa dupla, na pesquisa de quatro grupos de microrganismos (bactérias aeróbias totais, coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*). A incisão do tecido apresentou mais eficiência que os demais métodos pesquisados. Mesmo assim, não foi recomendado pelos pesquisadores por se tratar de um método destrutivo.

QUEVEDO *et al.* (1992), realizaram análises em amostras coletadas pela incisão de tecidos e por zaragatoa; os resultados obtidos mostraram que através de incisão do tecido coletou-se um número de microrganismos superior ao número coletado pela zaragatoa, mas os pesquisadores recomendaram o método de amostragem por zaragatoa

para a coleta de microrganismos em carcaças inteiras por oferecer a possibilidade da amostragem sem danificar a superfície externa da carcaça.

SILVA & JUNQUEIRA (1995), recomendam a incisão do tecido, zaragatoa e ágar contato direto como sendo os métodos mais apropriados para a análise da superfície desses alimentos, porém o método mais apropriado a ser utilizado nessa amostragem é a zaragatoa, principalmente para carcaça, ou seja, quando não se deseja destruir a superfície amostrada.

O método de amostragem por zaragatoa, apesar de não recuperar todos os microrganismos presentes na superfície da amostrada e da dificuldade de sua reprodutibilidade é largamente utilizado, pela facilidade de sua execução e principalmente por ser um método não destrutivo capaz de ser executado rotineiramente nas linhas de abate comerciais (ANDERSON *et al.*, 1987).

2.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são classificados como conservadores ou como acidulantes pela legislação brasileira no Decreto nº 55.871 de 23/06/1965 (BRASIL, 1965), definidos como substâncias adicionadas aos alimentos com vista a impedir ou retardar a ação microbiana ou enzimática, protegendo o alimento contra a degradação.

O Decreto nº 55.871 de 23/06/1965 (BRASIL, 1965), em seu artigo nº 8, proíbe o uso de aditivo em alimento quando: a) houver evidência ou suspeita de que o mesmo possui toxicidade atual ou potencial; b) interferir sensivelmente e desfavoravelmente no valor nutritivo do alimento; c) servir para encobrir falhas no processamento e nas técnicas de manipulação; d) encobrir alterações e adulteração na matéria-prima ou no produto já elaborado; e) induzir o consumidor ao erro, engano ou confusão.

O termo ácido orgânico é empregado na produção animal e refere-se aos ácidos fracos, de cadeia curta (C1-C7) (DIBNER & BUTTIN, 2002), que produzem menor quantidade de prótons por molécula ao se dissociarem. Por serem expressos logaritmicamente, uma unidade de pH acima do pKa de um ácido indica que 90% do ácido encontra-se na forma não dissociada e, com duas unidades de pH acima do pKa, 99% do ácido estará não dissociado. Isso é particularmente importante no processo digestivo, pois na dependência do pH dos compartimentos digestivos haverá ação ou não do ácido em questão.

Algumas limitações para o uso de ácidos orgânicos como inibidores bacterianos em alimentos são as seguintes: i) geralmente são ineficientes quando a população inicial é alta; ii) alguns microrganismos usam ácidos orgânicos como fonte de carbono metabolizável; iii) existe uma variabilidade inerente na resistência de diferentes cepas; iv) há possibilidade de seleção de cepas resistentes com o uso (XAVIER, 1997).

A eficiência dos ácidos orgânicos no controle dos patógenos depende do agente químico utilizado, da concentração do agente, da forma de aplicação, da temperatura, do tempo de contato e da análise dos resultados (VASCONCELOS *et al.*, 2002).

Além dos ácidos orgânicos como os ácidos acético, láctico, adípico e succínico, substâncias como cloro, antibióticos, b-propiolactona, também têm sido utilizadas como inibidores do desenvolvimento de microrganismos na superfície da carne de frango (SILVA, 1999b).

Os produtos cárneos acidificados pela adição de ácidos orgânicos comestíveis ou pela fermentação natural têm seu pH diminuído, inibindo o crescimento de vários deterioradores, entre eles as *Pseudomonas*, gênero de microrganismos muito

importante na deterioração de carnes, e que cresce bem em pH próximo a neutralidade (XAVIER, 1997).

ARDERSON *et al.* (1977), afirmam que três fatores são responsáveis pela ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos: o efeito do pH, a dissociação do ácido e a especificidade da molécula de ácido.

Os ácidos orgânicos têm maior eficiência como inibidores bacterianos em condições de baixa temperatura, e maior efeito bactericida com o aumento da temperatura, bem como maior eficiência em condições anaeróbias do que aeróbias (CHICHISTER & TANNER, 1972).

Segundo CANHOS & DIAS (1983), quanto mais ácido o meio, maior será a capacidade de inibição destes e uma diminuição de uma unidade do pH implica em um aumento de até 10 vezes do efeito inibitório.

A eficiência de um ácido orgânico como agente antimicrobiano em qualquer alimento é afetada por condições como: atividade de água, pH, potencial óxido-redução, disponibilidade de substrato, teor de gordura, entre outros. (SILLIKER & GABIS, 1986).

De acordo com SILVA & BERAQUET (1997), outro fator de igual importância na seleção de um ácido orgânico é a microbiota que esse ácido deve inibir, por exemplo: número, tipo e resistência dos microrganismos provavelmente presentes. Portanto, a escolha de um ácido depende não só das características inerentes àquele ácido orgânico (atividade antimicrobiana apropriada, solubilidade, compatibilidade com as características organolépticas do alimento), mas também das condições do microambiente e de estocagem do alimento.

Os agentes sanitizantes, de um modo geral, podem causar injúrias subletais nos microrganismos da superfície da carne. O grau de injúria varia com o tipo de tratamento, espécie microbiana, além das condições de produção e estocagem (SILVA, 1996).

O efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos depende do seu pKa e do pH do meio externo. À medida que se diminui o pH do alimento, aumenta-se a proporção de moléculas de ácido na forma não-dissociada e, conseqüentemente, sua eficiência como agente antimicrobiano (CHICHISTER & TANNER, 1972).

Os ácidos fracos são mais eficientes que os ácidos fortes, visto que os ácidos fracos são capazes de acidificar o interior da célula. Os ácidos comestíveis sofrem dissociação em sistema aquoso, os íons de H⁺ livres e os componentes não dissociados da solução podem ser fatores decisivos na atividade antimicrobiana desses compostos (DICKSON & ANDERSON, 1992).

Os ácidos láctico e acético apresentam um pKa 3,86 e 4,75, respectivamente. Portanto, o uso dos mesmos é limitado principalmente para alimentos com pH superior a 5,5, como é o caso da carne bovina. Entretanto, quando usados em altas concentrações, são agentes eficientes contra uma grande variedade de microrganismos (CHICHISTER & TANNER, 1972).

BAIRD-PARKER (1980), defende a hipótese que os ácidos orgânicos inibem ou eliminam o crescimento dos microrganismos pela interferência na permeabilidade da célula microbiana, afetando o transporte de substâncias e fosforilação oxidativa do sistema de transporte de elétrons.

Ultimamente, o uso de ácidos fracos particularmente os ácidos láctico e acético, vêm sendo objeto de grande interesse na redução da carga bacteriana da carne fresca (HAMBY *et al.*, 1987; SILVA & BERAQUET, 1996).

O ácido acético e o ácido láctico podem ser utilizados como sanitizantes em carcaças de animais abatidos para consumo humano, pelo fato de sua toxicidade ser alta contra os microrganismos e baixa contra os humanos (SILVA, 1999b).

A ação microbiana dos ácidos láctico e acético é devida à capacidade de suas moléculas, lipofílicas e não dissociadas, de penetrar na membrana plasmática bacteriana. No citoplasma, onde o pH é mais alto, o ácido se dissocia e rompe a força próton-motriz da membrana alterando o rendimento energético e o transporte dependente de energia dentro da célula (SMULDERS *et al.*, 1986).

Os ácidos acético, cítrico e láctico, empregados com acidulantes, também exercem efeito conservador. Entre eles, o ácido acético é o mais eficiente. Algumas bactérias são tolerantes a esse ácido, entre elas o *Acetobacter*, certas bactérias lácticas, e bolores e leveduras (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O uso de ácido acético é permitido como corretivo de pH, nas condições da Resolução n. 25/70 (ABIA, 1989), em diversos alimentos como: em alguns tipos de queijos (1,0%), peixes em conserva (1,0%), carnes em conserva (1,0%), não havendo referência ao seu uso na carne *in natura*.

O ácido acético é fracamente dissociável, atua basicamente pelo mecanismo dos componentes não dissociados. O ácido acético provoca uma pequena redução no pH da carne bovina, o que é considerado importante na sua atividade antimicrobiana (OSTHOLD *et al.*, 1984).

A atividade antimicrobiana do ácido acético em substrato acidificado a pH 3,0 é de 10 a 100 vezes superior à de qualquer outro ácido e é duplicada entre o pH 5,0 e 6,0, enquanto a parte não dissociada nessa faixa é cerca de 7 vezes menor (LUCK, 1981).

O ácido acético tem um fraco poder bacteriostático, sendo, portanto, necessário empregar concentrações mais elevadas para se preservar um produto à temperatura ambiente (CANHOS & DIAS, 1983).

O ácido acético e seus sais são bastante eficientes e largamente usados como acidulantes e conservantes nos alimentos. Sua ação conservadora é atribuída à queda de pH provocado no meio, e sua atividade microbiana inicia-se em concentrações superiores a 0,5% (PARDI *et al.*, 1994).

2.4 Efeito dos ácidos orgânicos na extensão da vida de prateleira de carnes

ANDERSON *et al.* (1977), estudaram o efeito de várias concentrações de ácido acético (0,1, 2,0 e 3,0%), em diferentes temperaturas (25, 40, 55 e 70°C), na redução de várias espécies de microrganismos (*Enterobacteriaceae*, *E. coli* e *Salmonella typhimurium*) inoculados à superfície de carne bovina e observaram uma redução significativa da microbiota inicial existente em carcaça de carneiro pela aspersão de uma solução contendo 3% de ácido acético a 55°C.

DRESSEL & LEISTNER (1984), estudaram o efeito da imersão de carcaças de frango em uma solução contendo 2,0% de ácido acético, 1,0% de ácido láctico, 0,25% de ácido cítrico e 0,1% de ácido ascórbico no crescimento de *Salmonella* sp.. Observaram uma redução de aproximadamente 10 vezes nas contagens totais das amostras tratadas. Durante a estocagem a 2°C por 10 dias não houve crescimento de *Salmonella* sp. e a 10°C, embora o crescimento não tenha sido totalmente suprimido, foi

mais lento do que nos controles não-tratados. A vida-de-prateleira das amostras tratadas foi aproximadamente o dobro das não-tratadas, mas as primeiras apresentaram um ligeiro odor ácido e a superfície ligeiramente pálida.

RISTIC & OSTHOLD (1984), avaliaram o efeito antimicrobiano da imersão de carcaças de frango em várias soluções ácidas (ácidos láctico, acético, cítrico e ascórbico) a 1,0 e 2,0% por 1 minuto e em solução de sorbato de potássio a 20% por 5 e 10 segundos, durante a estocagem entre 1 e 10 °C por 13 dias. Tanto o tratamento com ácidos quanto com sorbato foi eficiente no controle microbiano e aumentaram a vida útil do produto, mas os resultados foram melhores com o sorbato de potássio, principalmente devido à melhor aparência das carcaças. Os tratamentos com ácidos causaram queda do pH tanto da pele quanto dos músculos, o que provocou maior exsudação.

OKREND *et al.* (1986), estudaram o efeito do ácido acético em solução de 1,0; 0,2; 0,1; e 0,028% (v/v) na taxa de letalidade de *Salmonella newpost*, *S. typhimurium* e *Campylobacter jejuni*, aplicado a 52°C, na água de escalda de aves. Verificaram que a adição de 0,1% de ácido acético reduziu um ciclo logarítmico na contagem para os três tipos de bactérias.

LILLARD *et al.* (1987), estudaram o efeito da adição de 0,2 a 0,5% de ácido acético em água escaldada e carcaças de frango. Os autores confirmaram a redução dos níveis de bactérias aeróbias totais e enterobactérias na água de escalda, sendo que a presença de *Salmonella* não foi detectada. No entanto, a redução das contagens nas carcaças não foi significativa. Também concluíram que o tratamento da água de escalda com ácido acético pode ser efetivo na redução de contaminações cruzadas entre as carcaças, mas não tem efeito significativo na redução da contaminação das carcaças em si.

DICKSON (1988) reduziu 76% da presença de *Salmonella* sp. na superfície da carcaça bovina, após o tratamento com uma solução de ácido acético a 2,0%.

SIRAGUSA & DICKSON (1993), realizaram tratamentos por aspersão de amostras de carne bovina contaminadas artificialmente com *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *E. coli* O157:H7 com solução contendo 2% de ácido acético com ou sem alginato de cálcio. Após a estocagem das amostras a 5°C, por 7 dias, verificou-se que a aspersão da solução do ácido acético com o alginato de cálcio foi mais efetiva contra *Salmonella typhimurium* do que contra *Listeria monocytogenes*. O tratamento não apresentou efetividade contra *E. coli* O157:H7.

FREDERICK *et al.* (1994), reduziram significativamente a presença de *Salmonella* sp. em carne de porco, utilizando uma solução de ácido acético 2,0%, resultados esses que confirmam a eficiência do ácido acético como inibidor da presença de *Salmonella* sp.

FU *et al.* (1994), estudaram a qualidade microbiológica da carne de lombo de porco, provenientes de carcaças borrifadas com soluções de 1,5% de ácido acético, ácido cítrico e ácido láctico, embalada a vácuo e armazenada entre 0 e 2°C por 42 dias. Verificaram que os ácidos acético e cítrico mostraram inicialmente um decréscimo na contagem padrão em placa. Este efeito, porém, não continuou depois de 14 dias de estocagem das amostras embaladas a vácuo.

CONNER & KOTROLA (1995), avaliaram o efeito da redução do pH na taxa de sobrevivência de *E. coli* por meio do uso dos ácidos acético (pH 5,2), cítrico (pH 4,0), láctico (pH 4,7), málico (pH 4,0) e tartárico (pH 4,1) em caldo seletivo e verificaram que a incubação a 25°C houve um aumento de 2 a 4 ciclos logarítmicos para todos os tratamentos, mas a 10°C ou a 4°C não houve crescimento exceto na amostra controle.

DICKENS & WHITEMORE (1995), utilizando o ácido acético em concentrações próximas a 0,6% na superfície de carnes de frangos, verificaram uma redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico na contagem total de aeróbios após o tratamento.

PODOLAK *et al.* (1995), estudaram o efeito da imersão em ácido fumárico de 0,5 a 2,5%, ácido acético a 1% e ácido láctico a 1% a 55°C por 15 ou 30 segundos na redução de *Lysteria monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7 e *Salmonella typhimurium* durante a estocagem de carne bovina a 4°C. Os autores observaram maior efeito bactericida com o maior tempo de imersão (30 s) para todos os tratamentos e que todos os ácidos utilizados apresentaram tanto efeito bactericida imediato quanto residual durante a estocagem, sendo o melhor efeito residual o encontrado para o ácido fumárico a 1,5%.

A sanitização da carcaça bovina, logo depois do abate, pela aspersão da solução composta por 2,0% (v/v) de ácido acético, 1,0% de ácido láctico (v/v), 0,25% de ácido cítrico (v/v) e 0,10% de ácido ascórbico (v/v) reduziu em mais de 90% a carga microbiana existente, e manteve baixa as contagens totais de bactérias psicrotróficas e de bolores e leveduras durante 15 dias de armazenamento a $7\pm 2^\circ\text{C}$, sem afetar a sua aparência. O tratamento reduziu o pH superficial dos músculos na faixa de 4,0 a 4,2. Contudo, após um dia de armazenagem, já não se observou diferença ($p>0,05$) nos músculos submetidos aos tratamentos e dos controles (SILVA & BERAQUET, 1995).

A sanitização com ácidos, em baixas concentrações na superfície da carne, reduz a contagem de microrganismos, particularmente *Salmonella* sp. e outras enterobactérias, não penetram significativamente o tecido e o pH da superfície retorna ao normal de 48 a 72 horas depois da aplicação (SILVA, 1996).

A aplicação de ácidos orgânicos como o ácido acético e o ácido láctico a 1%, bem como o sorbato de potássio a 2% aumentou a vida de prateleira do filé de peito de frango embalado em sacos de polietileno para 10 a 14 dias, sendo o efeito do ácido acético mais eficiente na redução das contagens bacterianas, principalmente de enterobactérias (XAVIER, 1997).

PUGA *et al.* (1999), estudaram o efeito de várias técnicas de amaciamento sobre a maciez subjetiva e a força de cisalhamento do músculo *Triceps brachii*. Os músculos foram submetidos a tenderização mecânica, à injeção de ácido acético 0,1 M e ácido láctico 0,2 M, à maturação por 9 e 14 dias, à estimulação elétrica (250 V - 60 Hz-90s). Verificaram que a injeção de ácidos e a maturação por 9 dias não apresentaram efeito significativo sobre a textura da carne tratada.

SILVA (1999a), submeteu o músculo *Tensor da fascia latae* bovino à sanitização com soluções de ácidos orgânicos, alginato de cálcio e sorbato de potássio, com o objetivo de reduzir a contaminação natural e aumentar a sua vida-de-prateleira. Os tratamentos reduziram significativamente a carga microbiana dos músculos e mantiveram essa redução por um período de 10 dias. Aos sete dias de armazenamento, as amostras submetidas ao tratamento com a solução de ácidos orgânicos mais sorbato de potássio e as tratadas com solução de ácidos orgânicos mais alginato de cálcio foram rejeitadas pela equipe de análise sensorial.

SILVA (1999b) sanitizou metades de carcaças de animais recém-abatidos com solução de ácidos orgânicos e armazenou-as a $7\pm 2^{\circ}\text{C}$. Aos cinco, oito e quinze dias de estocagem, as carcaças foram desossadas e submetidas às análises microbiológicas. O tratamento reduziu, em aproximadamente dois ciclos logarítmicos, a contagem total de bactérias psicrótróficas na superfície das carcaças e manteve essa redução durante 15 dias de estocagem. Nas metades de carcaças tratadas, a quantificação de bolores e leveduras só foi possível aos 11 dias de armazenamento, enquanto que no controle, no

quinto dia, a contagem desses microrganismos foi superior a um ciclo logarítmico. A análise sensorial não detectou diferença na aparência das carcaças. Os cortes obtidos das metades das carcaças sanitizadas apresentaram contagens microbianas inferiores às do controle, diferença mantida durante todo o armazenamento. Após oito dias, os cortes obtidos da metade da carcaça controle, desossada aos oito dias de estocagem, apresentaram contagens superiores a 10^6 UFC/cm², enquanto que os cortes obtidos da metade da carcaça sanitizada, aos 11 dias, não atingiram esse valor. A análise sensorial não detectou diferença na aparência das carcaças.

SILVA *et al.* (2001) estudaram a eficácia das soluções de ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) e suco de limão na superfície da carcaça de aves, como forma de reduzir a carga microbiana, observando o efeito destas substâncias 60 minutos depois de sua aplicação. Utilizaram soluções de ácido láctico e acético 1,0% (v/v) e 2,0% (v/v) e o suco de limão integral e diluído a 50% (v/v). O suco de limão foi o mais eficiente dos tratamentos na redução da contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos reduzindo esta contagem em 1,9 e 2,1 ciclos logarítmicos. O número mais provável de coliformes totais e fecais foi reduzido em 1,3 e 1,2 log NMP/cm², respectivamente. As soluções de ácido acético 1,0% (v/v) e 2,0% (v/v) foram as mais efetivas na redução da contagem total de bolores e leveduras provocando uma diminuição de 1,1 e 0,9 ciclos logarítmicos, respectivamente. A presença de *Salmonella* sp. foi inibida em 100% das carcaças submetidas ao tratamento com a solução de ácido acético 2,0% (v/v). O ácido foi considerado como uma segunda opção de uso, na redução da contagem total de bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras, coliformes totais e fecais.

VASCONCELOS *et al* (2002) estudaram a microbiota da carcaça e da carne ovina tratada com ácido acético, embalada a vácuo e maturada por 48 dias e concluíram que o tratamento com ácido acético 1%, seguido de embalagem a vácuo e temperatura de armazenamento de 1°C não afeta o pH, inibe o crescimento de bactérias mesófilas, bolores e leveduras por duas semanas e o de bactérias de grupo coliformes por 6

semanas, na carne ovina maturada. O ácido acético 1% não é eficiente para inibir o crescimento de bactérias do gênero *Salmonella*. Os resultados sugerem que a imersão das carnes em ácido acético 1% seguida de estocagem a vácuo permite manter as carnes refrigeradas (1°C) por 13 dias, com controle eficiente da microbiota deteriorativa, mantendo um padrão higiênico-sanitário adequado, mas não é suficiente para inibir o crescimento de *Salmonella* sp..

2.5 Outras aplicações do ácido acético

O ácido acético ou vinagre, de acordo com a literatura, é utilizado no tingimento de tecidos de seda, como acidulante e conservante de alimentos, solvente de goma, resina, óleos voláteis e outras substâncias, agente desinfetante, no tratamento de verrugas, na escleroterapia de cistos renais, nos acidentes caseiros como a queimadura, no corte da pele com faca; no gargarejo para processos inflamatórios da boca e garganta, no tratamento de otites, na picada de insetos, no diagnóstico de neoplasias do cérvix uterino e como agente anti-séptico para feridas abertas, especialmente, onde há suspeita de *Pseudomonas* (BENASSATI *et al.*, 1994; THORP *et al.*, 1998; CRONJE *et al.*, 2000; BELINSON *et al.*, 2001; GALVANE *et al.*, 2002; JUNG *et al.*, 2002).

WOODART (1989), aplicou solução de vinagre diluído a 50%, embebida na toalha sobre a área queimada. O alívio da dor foi dramaticamente suavizado em dez minutos e a cicatrização evoluiu sem complicações.

O ácido acético tem sido empregado em sua forma diluída como um antimicrobiano, a *Haemophilus* e *Pseudomonas* sp., como antifúngico e antiprotozoário vaginal, irrigações e preparações tópicas para a pele e unhas, ou gotas para ouvidos, como expectorantes, como espermicida, loção adstringente calosidades, queimaduras provocadas por água viva (vinagre ou 3 a 10% de solução de ácido acético) e como cáustico (MARTINDALE, 1996).

PEREIRA (2002), em estudo experimental *in vitro* analisou a concentração e tempo de exposição de ácido acético e vinagre para inibir o crescimento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de feridas do paciente por meio de *swab*. Verificou que duas cepas foram sensíveis ao ácido acético a 0,5%, três cepas a 0,6% e duas a 0,7% de acidez. Em relação ao vinagre, uma cepa foi sensível a 10% e todas as outras a 15%.

UTYAMA (2003), estudou *in vitro* a atividade antimicrobiana do ácido acético e do vinagre por meio Técnica de Difusão de Poço sobre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus* e determinou a Concentração Inibitória Mínima (CMI). Verificou que, pelo método de difusão de poço, os vinagres branco e tinto (30,0 e 25,0%) e o ácido acético a 1,0 % são mais eficazes que o ácido acético a 0,7%, vinagre branco e tinto a 10,0% ($p < 0,05$) sobre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e não apresentaram ação antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido acético nas cepas avaliadas foi a 0,25%, e do vinagre branco a 2,0% para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* sendo que para *Staphylococcus aureus* a 3,0%. As cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli* foram todas inibidas pelo vinagre tinto a 1,5%, e sobre as de *Staphylococcus aureus* a 3,0%.

NASCIMENTO *et al.* (2003), compararam a eficiência do hipoclorito de sódio 200ppm, dicloroisocianurato de sódio 200ppm, ácido acético 2,0% e 4,0%, ácido peracético 80 ppm e vinagre 6,0%, 25,0% e 50,0% na sanitização de uva. As amostras foram mantidas em contato com as soluções sanitizantes por 15 minutos e a eficiência dos tratamentos foi avaliada pelo número de reduções decimais na contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras e coliformes totais. A análise estatística dos resultados demonstrou que todos os sanitizantes testados apresentaram eficiência semelhante ou superior ao hipoclorito de sódio 200 ppm.

ALMEIDA *et al.* (2005), estudaram a eficácia de diferentes tratamentos de sanitização em alimentos. Foram utilizados o brócolo e o alface, obtidos no comércio local de Curitiba (PR). O hipoclorito de sódio, cloro orgânico, iodo, ácido acético, ácido peracético, ácido cítrico foram os sanitizantes em estudo, com diferentes tempos de contato e concentração. Todos os sanitizantes testados no alface foram eficientes, com exceção do ácido cítrico 100 mg/L durante 10 minutos que não reduziu significativamente a contagem de bolores e leveduras. No brócolo vários sanitizantes não foram eficazes, embora alguns tenham reduzido no mínimo um tipo de microorganismo, porém, o cloro orgânico 250 ppm por 15 minutos não reduziu nenhuma espécie de microorganismo em estudo.

Objetivos Gerais

a) Avaliar a microbiota presente na superfície de cortes de dianteiro bovino e observar o seu comportamento na carne tratada com vinagre, embalada a vácuo e armazenada por 45 dias a temperatura de $5\pm 2^{\circ}\text{C}$;

b) Aumentar a vida-de-prateleira da carne bovina *in natura*, utilizando o vinagre, pelo método de aspersão.

Objetivos Específicos

a) Avaliar a atividade antimicrobiana do vinagre por meio do Método de Difusão em Poço sobre as cepas isoladas da carne bovina;

b) Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) do vinagre sobre as cepas isoladas da superfície da carne bovina;

c) A partir da CMi do vinagre, avaliar o crescimento de microrganismos deteriorantes presentes na superfície da carne bovina *in natura*, aumentando seu tempo de vida útil;

d) Comparar o tempo de prateleira dos cortes de dianteiro, embalados a vácuo, sem tratamento e tratados com vinagre após o abate e após a desossa.

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Vinagre

O vinagre de álcool concentrado, acidez de 9,4% (p/v), utilizado nos experimentos foi doado pela Empresa Vinagre Saboroso, localizada na cidade de Lucélia, no Estado de São Paulo.

3.2 Carne Bovina

Foram utilizadas 14 carcaças bovinas, machos ou fêmeas, Sem Raça Definida (SRD), com idade aproximada de 24 meses, provenientes do abatedouro Beira Rio localizado na cidade de Santa Cruz do Rio Pardo, no Estado de São Paulo. A empresa possui capacidade de abate de 100 cabeças/dia. De cada carcaça obtêm-se 2 metades de carcaças e, conseqüentemente, 2 cortes de dianteiro. Dessas, 4 foram utilizadas como controle (C) e 8 nos tratamentos propostos no item 3.4.5. As outras 2 carcaças usadas na determinação da atividade antimicrobiana do vinagre, descrita no item 3.4.4.

3.3 Meios de Cultura

Os reagentes utilizados no preparo dos meios de cultura e soluções foram de grau analítico. As tabelas 2 e 3 descrevem os meios utilizados nas análises microbiológicas.

Tabela 2. Meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos.

Meios	Sigla	Marca	Lote
Peptona Bacteriológica	-	MERCK	25
Plate Count Agar	PCA	DIFCO	4355381
<i>Pseudomonas</i> Agar	AP	Formulado	-
<i>Lactobacillus</i> MRS Broth	MRS	DIFCO	137557XB
Potato Dextrose Agar	ABG	MERCK	312
Caldo Lauril Sulfato Triptose	LST	DIFCO	5007842
Caldo <i>Escherichia Coli</i>	EC	MERCK	304
Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2%	VB	DIFCO	33588
Caldo Nutriente	CN	DIFCO	4223326
Ágar Bacteriológico	-	OXOID	819274-02

Tabela 3. Formulação do meio AP (g/L; pH 6.5-6.8).

Componentes	g/L
Triptona	10
Proteose Peptona nº 03	10
Fosfato Dipotássico	1.5
Sulfato de Magnésio	1.5
Glicerol	10
Ágar	15

3.4 Metodologia Experimental

3.4.1 Preparo da amostra

Usou-se a técnica de *swab* em uma área delimitada por um molde estéril composta de 100 cm² (25x25 cm²). O esfregaço foi realizado em 3 pontos ao acaso na superfície de cortes de dianteiro. Os *swabs* foram introduzidos em tubos contendo uma solução salina peptonada 0,1%, durante trinta minutos. Após este período, alíquotas da solução foram inoculadas nos meios descritos no item 3.3.

3.4.2 Isolamento dos microrganismos

Os microrganismos foram isolados em duas coletas, uma realizada em novembro de 2004 e outra em maio de 2005. Para cada coleta utilizou-se uma carcaça. As análises microbiológicas para a obtenção dos isolados foram a partir dos meios PCA (32°C, 48 h), AP (25°C, 72 h), MRS (32°C, 72 h) e ABG (25°C, 5-7 dias).

3.4.3 Análises microbiológicas

As contagens de bactérias mesófilas aeróbias e psicrotróficas foram realizadas pelo método de plaqueamento em profundidade (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1990). Alíquotas de 1,0 mL da amostra foram inoculadas em placas de Petri estéreis. O meio de cultura PCA foi vertido sobre as mesmas, seguindo-se a incubação em estufa a 32°C por 48 horas para a contagem de mesófilas e a 7°C por 10 dias, para psicrotróficas.

Para a realização de contagem de *Pseudomonas* sp. Utilizou-se o método de plaqueamento em superfície segundo MEAD & ADAMS (1977). Alíquotas de 0,1 mL

da amostra foram inoculadas em placas de Petri estéreis contendo o meio de cultura AP. As placas foram incubadas a 25°C por 72 horas.

A contagem de bactérias lácticas foi realizada pelo método de plaqueamento em profundidade, segundo VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992). Alíquotas de 0,1 mL da amostra foi incubada em placas de Petri estéreis e, em seguida, o meio de cultura MRS foi vertido sobre as mesmas. Após a solidificação do ágar, a superfície das placas foi recoberta por uma sobrecamada do mesmo meio, a fim de promover uma atmosfera microaerófila. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 32°C por 72 horas.

A contagem de bolores e levedura foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície, segundo VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992). Alíquotas de 0,1 mL da amostra foram inoculadas em placas de Petri estéreis contendo o meio ABG acidificado com ácido tartárico 1%. As placas foram incubadas a 25°C por 5 -7 dias.

Para a determinação de coliformes fecais e coliformes totais usou a metodologia de tubos seriados, conforme descrita pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1991). Essa técnica compreende duas fases o teste presuntivo, o qual detecta a presença de microrganismos fermentadores da lactose, e o teste confirmativo, onde se determina a população real de coliformes totais e fecais.

O teste presuntivo foi realizado partindo das diluições preparadas de onde foram pipetadas alíquotas de 1 mL para uma série de três tubos contendo 9 mL do meio LST contendo tubo de Durham invertido. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e incubado a 36°C por 48 horas. Transcorrido este tempo foi observado se ocorreu à produção de gás nos tubos de fermentação (tubo de Durham). O teste confirmativo a partir de cada tubo positivo foi realizado.

No teste confirmativo, foi transferida uma alçada para os tubos contendo Caldo *E.C.* e Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2%, para confirmar a presença de coliformes fecais e totais, respectivamente. Os tubos com caldo EC foram incubados em banho-maria a 44,4°C por 24 horas e os com caldo Verde Brilhante, em estufa a 36°C por 48 horas. Anotou-se o número de tubos positivos e determinou-se o Número Mais Provável (NMP) em uma tabela de acordo com as diluições utilizadas e o resultado foi expresso em NMP de coliformes fecais/g.

3.4.4 Purificação dos isolados

Procedeu-se à triagem dos microrganismos que se desenvolveram em cada tipo de meio. A partir das diferenças macroscópicas, as colônias foram separadas para a purificação. As colônias foram transferidas para placas de Petri estéreis contendo o meio Ágar Nutriente e incubadas de acordo com a temperatura e tempo ideal de crescimento de cada isolado. Para a adequada purificação, repetiu-se este procedimento por no mínimo quatro vezes, acompanhando-se a pureza da cultura em microscópio óptico (RIBEIRO & SOARES, 1993). As linhagens isoladas foram submetidas aos seguintes testes de identificação: Coloração de Gram, Oxidase e Catalase.

3.4.4.1 Identificação Macroscópica dos isolados

Em cada colônia foram observadas as características descritas na Tabela 4 (PELCZAR *et al.*, 1981; MAEDA, 1997). Cada isolado (I) obtido foi registrado de acordo com o meio de cultura e com um número sequencial. Por exemplo, linhagens PCA I1 e AP I2 significam que foram isoladas a partir do meio PCA e do AP, respectivamente.

Tabela 4. Características Macroscópicas das colônias microbianas.

Características	Descrição
Forma	Circular; Irregular
Superfície	Lisa; Rugosa
Borda	Perfeita; Ondulada; Irregular; Serrilhada
Elevação	Plana; Elevada; Convexa
Pigmentação	Ausente; Amarelo Claro ou Escuro; Laranja; Rosea; Cinza
Detalhes óticos (D.O.)	Opaca; Transparente
Consistência	Viscosa; Membranosa
Diâmetro	Milímetros (mm)

3.4.4.2 Técnica de Coloração de Gram

A Técnica de Coloração de Gram foi realizada de acordo com BIER (1977).

3.4.4.3 Testes de Catalase e de Oxidase

Os testes de Catalase e de Oxidase foram realizados de acordo com a metodologia descrita por SPINOSA (2002).

3.4.4.4 Manutenção das colônias isoladas

As colônias isoladas foram mantidas em tubo inclinado com Agar Nutriente, a -5°C e repicadas a cada 30 dias.

3.4.5 Detecção da atividade antimicrobiana do vinagre

3.4.5.1 Preparo do inóculo

Para realização dos testes foram produzidos inóculos em meio Caldo Nutriente (CN). As linhagens previamente isoladas foram cultivadas em tubo contendo 3 mL de CN e incubadas de acordo com a temperatura e tempo ideal de crescimento. Decorrido o tempo de incubação, os tubos foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio CN que, novamente, foram incubados de acordo com cada isolado.

3.4.5.2 Técnica de Difusão em Poço

Verificou-se a atividade do vinagre *in vitro* pela técnica de Difusão em Poço. Alíquota de 1 mL da suspensão celular foi inoculada em placas de Petri estéreis em meio Agar Nutriente. Após a solidificação, fez-se no centro das placas, “poços” com diâmetro de aproximadamente 2 cm, onde aplicou 0,1 mL de vinagre diluído nas seguintes concentrações 6,3% (p/v), 4,2% (p/v) e 2,1% (p/v) de acidez. As placas foram incubadas de acordo com a linhagem isolada e após este período, determinou-se a atividade da solução vinagre, que foi quantificada pela medida do diâmetro do halo de inibição no crescimento microbiano.

A concentração testada foi em função da acidez encontrada no vinagre comercial (4,2% p/v). A partir dessa acidez, testaram-se concentrações abaixo (2,1% p/v) e acima (6,3% p/v).

3.4.5.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

O teste CMI do vinagre foi realizado de acordo com a metodologia descrita por EJECHI, NWAFOR & OKOKO (1999) e SOARES (2002). Foram realizados testes preliminares nas concentrações 6,3% (p/v), 4,2% (p/v) e 2,1% (p/v) de acidez (Tabela 5).

Tabela 5. Volumes utilizados nos testes preliminares de CMI.

% de acidez (p/v)	Inóculo (mL)	Vinagre (mL)	Meio de cultura (mL)
6,3	1	10.0	4.0
4,2	1	6.5	7.5
2,1	1	3.5	10.5

A partir destas concentrações, refinou-se o experimento e testou as concentrações 3,2% (p/v), 2,8% (p/v) e 2,4% (p/v) de acidez (Tabela 6).

Tabela 6. Volumes utilizados nos testes de CMI.

% de acidez (p/v)	Inóculo (mL)	Vinagre (mL)	Meio de cultura (mL)
2,4	1	4.0	10.0
2,8	1	4.5	9.5
3,2	1	5.0	9.0

O teste foi realizado em duplicata. Vinagre concentrado com acidez de 9,4% p/v foi adicionado em placas de Petri estéreis, em quantidade suficiente para se obter as concentrações de acidez descritas anteriormente, 1 mL da suspensão celular e quantidade suficiente de Agar Nutriente previamente esterilizado para totalizar um volume final de 15 mL. Após a mistura e solidificação do meio, as placas foram incubadas de acordo com a linhagem isolada.

Adotou-se como CMI a menor concentração de acidez que, após o período de incubação, não permitiu o crescimento das linhagens isoladas.

3.4.6 Aplicação do vinagre nos cortes *in natura*

As 12 carcaças utilizadas nos experimentos, após o abate, foram para a câmara fria a $0\pm2^{\circ}\text{C}$ por, aproximadamente, 20 horas. Depois deste período, seguiram para a desossa (Figuras 1a e 1b) e os cortes de dianteiro foram embalados a vácuo em sacos de material de baixa permeabilidade a gases (PA/EVOH/PE) com taxa de permeabilidade ao Oxigênio de $7,65\text{ cm}^3\text{ (CNTP)}/\text{m}^2/\text{dia}$. A estocagem das amostras foi em caixas de papelão que foram acondicionadas nas prateleiras da câmara de refrigeração a temperatura de $5\pm2^{\circ}\text{C}$ (Figuras 2a e 2b).



Figura 1a Desossa das carcaças e separação dos cortes de dianteiro bovino.



Figura 1b. Detalhes da desossa das carcaças.

	
<p>Figura 2a. Câmara de refrigeração onde foram acondicionados os cortes de dianteiro bovino embalados a vácuo utilizados nos experimentos.</p>	<p>Figura 2b. Prateleiras da câmara de refrigeração onde foram armazenadas as caixas contendo os cortes de dianteiro embalados a vácuo.</p>

A concentração do vinagre previamente determinada pelo teste CMI foi testada na superfície da carne bovina, conforme os tratamentos abaixo.

Tratamento A1: aspersão do vinagre nas carcaças logo após o abate.

Tratamento A2: aspersão do vinagre nos cortes de dianteiro desossados. Após a aspersão, os cortes foram deixados a gotejar por aproximadamente 1 minuto.

A aspersão do vinagre foi feita por um pulverizador de compressão prévia, com pressão de trabalho de 45 psi. A distância entre o bico do aspersor e a superfície da carcaça e dos cortes de dianteiro foi de aproximadamente 10 cm. Os tratamentos A1 e A2 foram acompanhados de amostra controle (C), sem a aplicação do vinagre.

3.4.6.1 Avaliação Microbiológica

Nos tempos (T) 0 e 20 horas e nos dias 20, 30, 37 e 45 após o abate, as amostras (A1, A2 e C) foram analisadas quanto a contagem de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, *Pseudomonas* sp., bactérias lácticas, bolores e leveduras e a pesquisa de coliformes totais e fecais, de acordo com as técnicas descritas no item 3.4.3.

3.4.7 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em duplicata. As variáveis estudadas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e as médias individuais comparadas através do Teste de Tukey ao nível de 95% de significância através do programa STATSTICA[®] 5.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características morfológicas dos isolados

Apesar do objetivo final desse trabalho não estar envolvido com a sistemática de microrganismos, considerou-se importante a etapa de caracterização dos isolados, uma vez que a caracterização é um pré-requisito na identificação e representa uma das bases da sistemática. Para obter-se uma identificação aperfeiçoada desses microrganismos, trabalhou-se com culturas purificadas.

Foram isoladas 5 colônias a partir do meio PCA, 4 do meio AP, 2 do meio MRS e 3 do meio ABG. As tabelas 7, 8, 9 e 10 apresentam detalhadamente as características macroscópicas das linhagens obtidas por isolamento.

Tabela 7. Identificação Macroscópica das colônias isoladas a partir do meio PCA.

Colônia	Diâmetro	Forma	Superfície	Borda	Elevação	Pigmentação	D. O.	Consist.
PCA I1	0,6 mm	Circular	Lisa	Perfeita	Plana	Ausente	Opaca	Viscosa
PCA I2	0,7 mm	Circular	Lisa	Ondulada	Elevada	Rosea	Opaca	Viscosa
PCA I3	0,6 mm	Circular	Lisa	Perfeita	Plana	Amarelo Claro	Opaca	Viscosa
PCA I4	0,8 mm	Circular	Lisa	Perfeita	Elevada	Amarelo Escuro	Opaca	Viscosa
PCA I5	0,9 mm	Irregular	Lisa	Ondulada	Plana	Laranja	Opaca	Viscosa

Tabela 8. Identificação Macroscópica das colônias isoladas a partir do meio AP.

Colônia	Diâmetro	Forma	Superfície	Borda	Elevação	Pigmentação	D. O.	Consist.
AP I1	0,4 mm	Circular	Lisa	Ondulada	Plana	Amarelo Claro	Opaca	Viscosa
AP I2	0,6 mm	Circular	Lisa	Ondulada	Plana	Ausente	Opaca	Viscosa
AP I3	0,7 mm	Circular	Lisa	Perfeita	Plana	Laranja	Opaca	Viscosa
API4	0,5 mm	Circular	Lisa	Perfeita	Plana	Ausente	Opaca	Viscosa

Tabela 9. Identificação Macroscópica das colônias isoladas a partir do meio MRS.

Colônia	Diâmetro	Forma	Superfície	Borda	Elevação	Pigmentação	D.O.	Consist.
MRS I1	3,3 mm	Circular	Lisa	Ondulada	Convexa	Ausente	Opaca	Viscosa
MRS I2	2,0 mm	Circular	Lisa	Ondulada	Convexa	Ausente	Opaca	Viscosa

Tabela 10. Identificação Macroscópica das colônias isoladas a partir do meio ABG.

Colônia	Diâmetro	Forma	Superfície	Borda	Elevação	Pigmentação	D.O.	Consist.
ABG I1	1,1 mm	Circular	Lisa	Perfeita	Elevada	Ausente	Opaca	Viscosa
ABG I2	0,9 mm	Circular	Lisa	Perfeita	Elevada	Ausente	Opaca	Viscosa
ABG I3	3,6 mm	Circular	Rugosa	Irregular	Elevada	Cinza	Opaca	Membran.

Verificou-se que do total de 14 colônias isoladas, 92,8% apresentaram-se em forma circular e 7,2%, de forma irregular. Quanto à superfície, 92,8% mostraram-se lisas e 7,2%, rugosas. Do total, 50,0% tinham bordas perfeitas, 42,8% ondulada e os 7,2% restantes apresentaram-se irregulares. As colônias desenvolvidas foram 50,0% planas e sem pigmentação. As outras apresentaram pigmentação amarelo claro (14,2%), amarelo escuro (7,2%), laranja (14,2%), rósea (7,2%) e cinza (7,2%). As opacas foram 100% das colônias isoladas. E quanto à consistência, 92,8% mostraram-se viscosas.

4.2 Técnica de Coloração de Gram

A taxonomia bacteriana convencional ainda usa características morfológicas e coloração de Gram, embora hoje em dia muitos desses procedimentos estejam sendo substituídos por métodos moleculares, considerados mais específicos e sensíveis. A Tabela 11 mostra os resultados obtidos no teste de Coloração de Gram.

Tabela 11. Resultados obtidos no Teste de Coloração de Gram.

Colônias Isoladas	PCA	AP	MRS
I1	Bacilo (+)*	Coco (-)	Bacilo (+)
I2	Coco (-)**	Coco (-)	Bacilo (+)
I3	Bacilo (+)	Coco (-)	
I4	Bacilo (+)	Coco (-)	
I5	Coco (-)		

*(+): Bactéria Gram positiva

**(-): Bactéria Gram negativa

Do total de 11 bactérias isoladas, 6 linhagens foram classificadas inicialmente como Gram negativas (-) e as demais (5 linhagens) como positivas (+). Todas as bactérias isoladas a partir do meio AP apresentaram formas de cocos. Os isolados no meio MRS apresentaram forma de bacilos. No meio para contagem padrão, 2 dos isolados apresentaram forma de cocos e 3 forma de bacilos.

4.3 Testes Catalase e Oxidase

As tabelas 12 e 13 mostram os resultados obtidos nos testes Catalase e Oxidase, respectivamente.

Tabela 12. Resultados obtidos no teste Catalase.

Colônias Isoladas	PCA	AP	MRS
I1	+	+	+
I2	-	+	+
I3	+	+	
I4	+	+	
I5	+		

*(+): Presença da catalase

**(-): Ausência da catalase

Todas as linhagens isoladas a partir do meio AP e MRS foram capazes de quebrar o Peróxido de Hidrogênio em água e oxigênio e, portanto, classificadas como catalase positiva (+). Somente um isolado do meio PCA foi classificado como catalase negativa (-).

Tabela 13. Resultados obtidos no Teste Oxidase.

Colônias Isoladas	PCA	AP	MRS
I1	- **	+ *	+
I2	-	-	+
I3	-	+	
I4	-	-	
I5	+		

*(+): Presença da oxidase

**(-): Ausência da oxidase

Na pesquisa da prova de oxidase, as colônias isoladas a partir do meio MRS foram classificadas como positiva (+). No meio PCA, somente um isolado apresentou oxidase positiva e, no meio AP 50% dos isolados foram oxidase negativo (-).

4.4 Detecção da atividade do vinagre

Na técnica de Difusão em Poço, as concentrações 2,1% (p/v), 4,2% (p/v) e 6,3% (p/v) de acidez apresentaram halos de inibição sobre todas as linhagens isoladas (Figuras 3a e 3b). Observou-se que os halos chegaram até 12,9 mm de diâmetro (Tabela 14). As linhagens que apresentaram os menores halos de inibição na concentração 2,1% de acidez foram isoladas a partir do meio PCA (I3) e do ABG (I2).



Figura 3a. Halos de inibição do isolado 2 do meio PCA.



Figura 3b. Halos de inibição do isolado 3 do meio AP.

Tabela 14. Halos de inibição das diferentes linhagens nas concentrações 2,1% (p/v), 4,2% (p/v) e 6,3% (p/v) de acidez.

Linhagens Isoladas	Halos de inibição (mm)		
	2,1% (p/v)	4,2% (p/v)	6,3% (p/v)
PCA I1	7,6	7,9	9,0
PCA I2	6,4	7,2	8,6
PCA I3	5,0	6,8	8,2
PCA I4	6,1	7,3	8,7
PCA I5	7,8	8,2	9,0
AP I1	5,3	6,4	8,7
AP I2	5,1	6,1	8,5
AP I3	5,1	6,0	7,4
AP I4	5,4	6,2	8,6
MRS I1	6,6	9,6	12,9
MRS I2	6,8	9,5	12,6
ABG I1	5,5	8,4	10,3
ABG I2	3,6	5,1	6,2
ABG I3	5,8	8,6	10,0

4.5 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

As concentrações iniciais testadas de 6,3% (p/v), 4,2% (p/v) e 2,1% (p/v) no teste CMI mostraram que nenhuma linhagem foi capaz de crescer nas concentrações 6,3% (p/v) e 4,2% (p/v). Os resultados obtidos indicaram que o teor de 2,1% (p/v) de acidez não foi suficiente para inibir todos os isolados, sendo que as linhagens PCA I3 e ABG I2 apresentaram crescimento (Tabela 15).

Tabela 15. CMI do vinagre obtida na inibição nos isolados.

Isolados	2,1 % (p/v)	4,2 % (p/v)	6,3 % (p/v)
PCA I1	+	+	+*
PCA I2	-**	+	+
PCA I3	+	+	+
PCA I4	+	+	+
PCA I5	+	+	+
AP I1	+	+	+
AP I2	+	+	+
AP I3	+	+	+
AP I4	+	+	+
MRS I1	+	+	+
MRS I2	+	+	+
ABG I1	+	+	+
ABG I2	-	+	+
ABG I3	+	+	+

*(+): Inibição do crescimento

**(-): Não inibição do crescimento

As Figuras 4a e 4b mostram que não houve crescimento nas concentrações 2,1% (p/v) e 4,2% (p/v) para as linhagens AP I4 e MRS I1.



Figura 4a. Teste de CMI com linhagem AP I4.



Figura 4b. Teste de CMI com linhagem MRS I1.

As Figuras 5a e 5b mostram que houve o crescimento dos isolados ABG I2 e PCA I3 na concentração de 2,1% (p/v) de acidez.



Figura 5a. Teste de CMI na linhagem ABG I2.



Figura 5b. Teste de CMI na linhagem PCA I3.

Para confirmar a CMI do vinagre testou as concentrações entre 4,2% (p/v) e 2,1% (p/v) de acidez. Os resultados mostraram que nenhuma linhagem foi capaz de crescer na concentração 2,4% (p/v). Portanto, adotou-se como CMI a acidez de 2,4% (p/v).

4.6 Evolução da microbiota da carne bovina durante o armazenamento.

O Código Sanitário do Estado de São Paulo (SP, 1992), determina as características microbiológicas para contagem padrão em placas de, no máximo, 10^6 UFC/g, bolores e levedura de, no máximo, 10^3 UFC/g e para o grupo coliforme de origem fecal de, no máximo, 10^2 NMP/g.

De acordo com XAVIER (1997), a contagem elevada de bactérias aeróbias mesófilas nos alimentos pode indicar abuso durante o armazenamento em relação ao binômio tempo/temperatura.

A contagem de bactérias mesófilas é empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos e estimar a vida útil da carne. De acordo com SILVA (1999a), o valor médio para a contagem de bactérias mesófilas em carcaças de bovinos é de aproximadamente 10^2 UFC/cm², valor diferente da média encontrada neste trabalho, que foi de 10^3 UFC/cm².

Os microrganismos aeróbios mesófilos são indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos indicando se a limpeza, a desinfecção e o tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada (ICMSF, 1984).

A Tabela 16 mostra os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras tratadas com vinagre A1 e A2 e no Controle (C) nos tempos 0 (T0h) e 20 horas (T20h) e 20 (T20d), 30 (T30d), 37 (T37d) e 45 (T45d) dias de armazenamento.

Tabela 16. Contagens microbianas em cortes de dianteiro submetidos aos tratamentos (A1 e A2) e não tratado (C) nos tempos 0 e 20 horas e 20, 30, 37 e 45 dias após o abate.

		Mesófilas	Psicrotróficas	<i>Pseudomonas</i>	Láticas	Bolores	Leveduras	C. Totais	C. Fecais
T0h	C	$2,4 \times 10^3$	$5,7 \times 10^2$	$4,4 \times 10^3$	<10	<10	<10	4	<3
	A1	$1,5 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$	$4,2 \times 10^2$	<10	<10	<10	<3	<3
	A2	$2,4 \times 10^3$	$5,7 \times 10^2$	$4,5 \times 10^3$	<10	<10	<10	4	<3
T20h	C	$8,6 \times 10^3$	$4,1 \times 10^2$	$7,2 \times 10^4$	$3,3 \times 10^2$	<10	<10	4	4
	A1	$2,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^1$	$4,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^1$	<10	<10	<3	<3
	A2	$5,6 \times 10^2$	<10	$3,3 \times 10^2$	<10	<10	<10	<3	<3
T20d	C	$3,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	9	4
	A1	$2,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$5,1 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	9	4
	A2	$2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$4,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	<3	<3
T30d	C	$2,1 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$
	A1	$1,9 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$6,2 \times 10^{11}$	$1,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^3$	$5,2 \times 10^5$	$4,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$
	A2	$1,5 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	<3	<3
T37d	C	$1,7 \times 10^{14}$	$3,0 \times 10^{14}$	$3,0 \times 10^{15}$	$1,4 \times 10^{13}$	$1,3 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$
	A1	$8,3 \times 10^{12}$	$1,8 \times 10^{13}$	$3,1 \times 10^{13}$	$2,1 \times 10^{12}$	$8,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
	A2	$4,3 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{13}$	$2,0 \times 10^{12}$	$4,5 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^3$	$4,9 \times 10^4$	$4,1 \times 10^1$	$4,6 \times 10^1$
T45d	C	$4,4 \times 10^{15}$	$7,7 \times 10^{15}$	$3,9 \times 10^{16}$	$2,5 \times 10^{15}$	<10 ³	$1,0 \times 10^3$	$6,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
	A1	$3,7 \times 10^{15}$	$1,3 \times 10^{15}$	$3,3 \times 10^{16}$	$1,7 \times 10^{15}$	<10 ³	$2,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$
	A2	$3,5 \times 10^{15}$	$7,3 \times 10^{15}$	$2,2 \times 10^{16}$	$2,4 \times 10^{15}$	<10 ³	$1,1 \times 10^4$	$1,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$

Foram realizadas nas amostras tratadas com vinagre A1 e A2 e no controle (C) análises estatísticas em cada tempo (T) de armazenamento. No T0h houve diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a amostra A1 e as amostras A2 e C para as contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas. Nas análises de *Pseudomonas* sp., bactérias lácticas, bolores e leveduras e de coliformes totais e fecais não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as amostras.

Pode-se inferir que o tratamento A1 é indicado para situações em que a carcaça será distribuída aos pontos de venda após o período de *Rigor Mortis*. As contagens microbianas sempre foram menores que a amostra controle (C).

No T20h as amostras não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) nas análises de bolores e leveduras e de coliformes totais e fecais. As contagens de bactérias mesófilas e lácticas apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos e também do controle (C). Nas contagens de psicrotróficas e *Pseudomonas* sp., os tratamentos A1 e A2 diferiram significativamente ($P < 0,05$) do controle (C).

No tempo T20d todas as contagens com exceção dos coliformes, apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$). Na análise de bolores, *Pseudomonas* sp. e bactérias lácticas os tratamentos A1 e A2 diferiram significativamente ($P < 0,05$) do controle. Nas contagens de leveduras e de bactérias mesófilas e psicrotróficas os tratamentos diferiram entre si e do controle ($P < 0,05$).

Em T30d as contagens de bactérias psicrotróficas, *Pseudomonas* sp. e lácticas não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$). As análises de bactérias mesófilas e coliformes totais apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos e também do controle. Na determinação de coliformes fecais, somente o tratamento A2 diferiu significativamente ($P < 0,05$) do controle (C). Na análise de leveduras, o tratamento A1 diferiu significativamente do controle (C).

No T37d todas as análises apresentaram diferenças significativas, com exceção da contagem de leveduras ($P>0,05$). Nas contagens de bactérias mesófilas, de psicotróficas e de *Pseudomonas* sp. os tratamentos A1 e A2 não diferiram ($P>0,05$) entre si, mas diferiram significativamente ($P<0,05$) do controle. Nas determinações de coliformes fecais e totais, bactérias lácticas e bolores houve diferença significativa ($P<0,05$) entre os tratamentos e o controle (C).

No T45d as amostras A1, A2 e controle apresentaram diferenças significativas ($P<0,05$) somente nas determinações de coliformes totais e fecais. A concentração de 2,4% (p/v) de ácido acético aplicado no tratamento A2 foi suficiente para inibir o crescimento de bactérias do grupo coliformes em intervalo de tempo até 45 dias. No tratamento A1, com aspersão de ácido acético a 2,4% (p/v) de acidez, após o abate, o número de coliformes permaneceu igual do controle (C) em 45 dias de armazenamento permitindo considerar que as condições higiênico-sanitárias no processo de desossa leva a recontaminação.

A Figura 6 mostra o comportamento das bactérias aeróbias mesófilas nas amostras A1, A2 e controle durante os 45 dias de armazenamento.

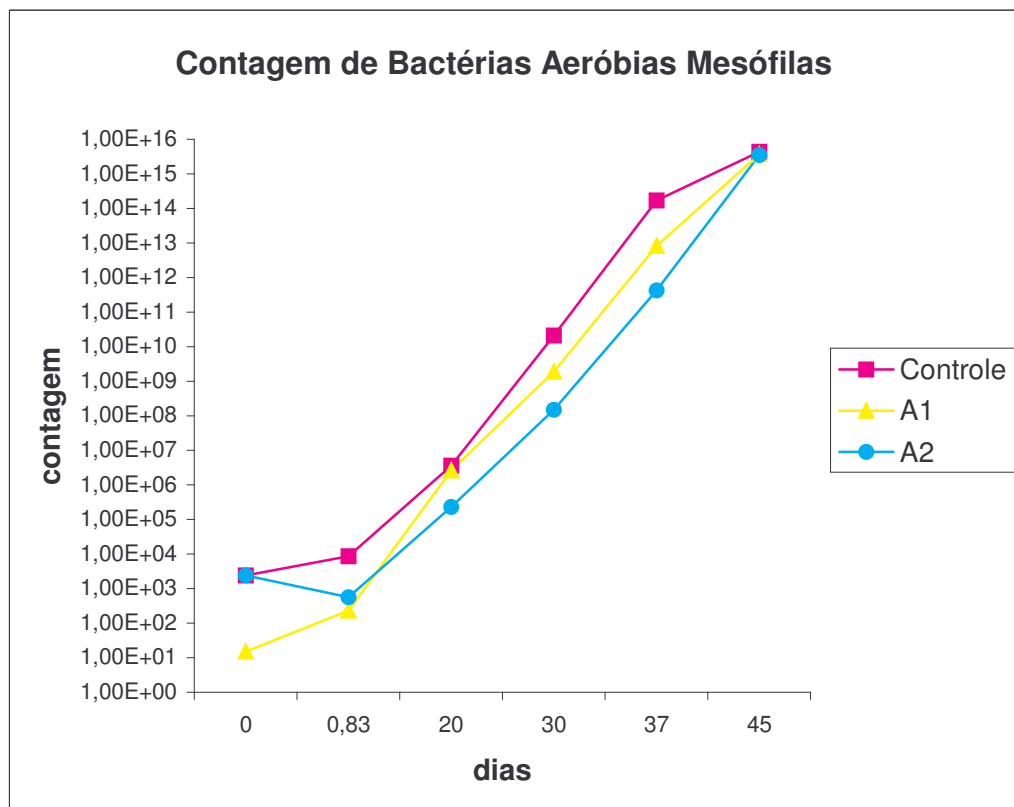


Figura 6. Gráfico da contagem das bactérias aeróbias mesófilas nas amostras em 45 dias de armazenamento.

As contagens de bactérias mesófilas nos tratamentos A1 e A2 apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) do controle até 37 dias de armazenamento. Nos dias 20 e 30 de armazenamento, os tratamentos A1 e A2 diferiram entre si ($P < 0,05$), sendo que o tratamento A2 apresentou contagem menor que o A1. Porém, em 20 dias de armazenamento somente as amostras tratadas com vinagre após a desossa (A2) estavam de acordo com Código Sanitário do Estado de São Paulo (SP, 1992).

Após 30 dias de armazenamento as amostras do tratamento A2 apresentaram contagem de bactérias mesófilas na casa de 8 ciclos logarítmicos e as do tratamento A1 e do controle (C) apresentaram contagens de 9 e 10 ciclos, respectivamente.

A Figura 7 mostra o comportamento das bactérias psicrotróficas nas amostras A1, A2 e C durante os 45 dias de armazenamento.

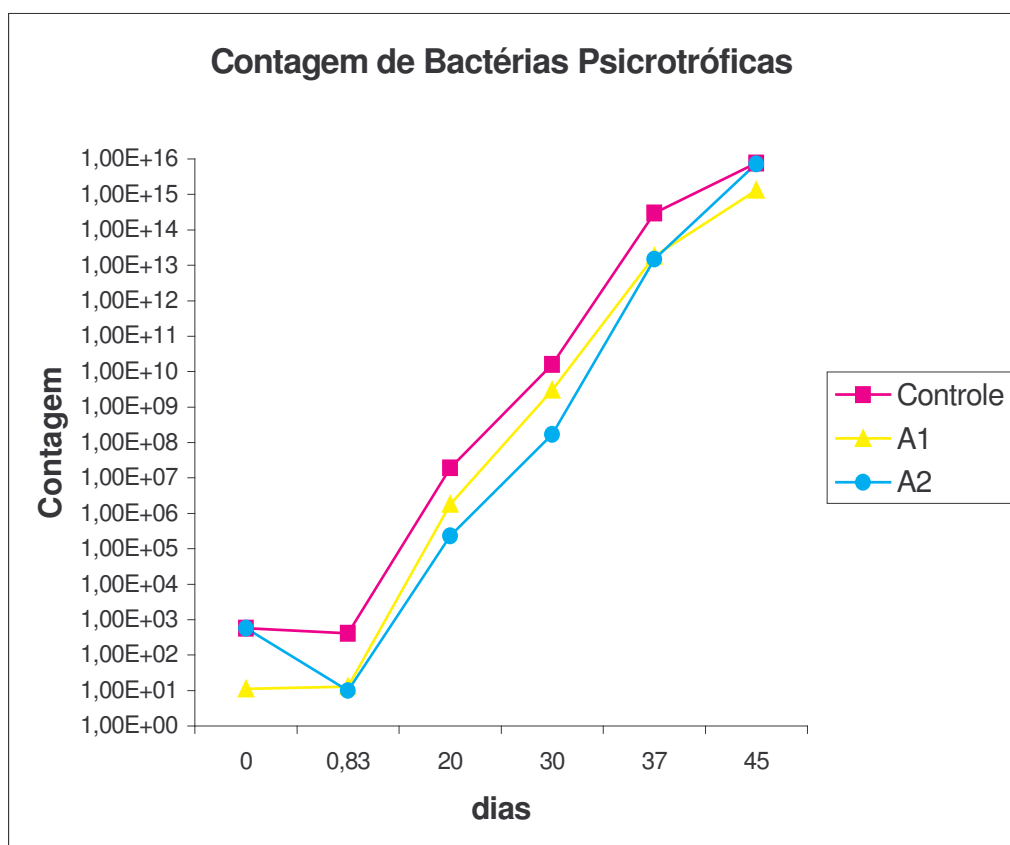


Figura 7. Gráfico da contagem das bactérias psicrotróficas nas amostras tratadas com vinagre A1 e A2 e no controle durante o período de armazenamento.

No dia 20 de armazenamento observou-se redução significativa ($P < 0,05$) no número de bactérias psicrotróficas nas amostras. Os tratamentos A1 e A2 apresentaram redução de 1 e 2 ciclos logarítmicos respectivamente em relação ao controle (C). Entretanto, com 30 dias de estocagem, não foi verificada diferenças significativas ($P > 0,05$) entre A1, A2 e C, sugerindo um efeito mais notório do ácido sobre as bactérias psicrotróficas apenas nos primeiros 20 dias de armazenamento.

O tratamento A2 em relação ao A1 mostrou uma diferença de 1 ciclo logarítmico para as contagens de bactérias mesófilas e psicrótróficas, em 20 dias de armazenamento. Essa diferença é provavelmente devido ao fato desta carne ter sido tratada com ácido imediatamente antes da embalagem em contraposição com o tratamento A1 que foi feito na carcaça.

A Figura 8 mostra o comportamento das bactérias *Pseudomonas* sp. nas amostras tratadas com vinagre, A1 e A2 e no controle durante os 45 dias de armazenamento.

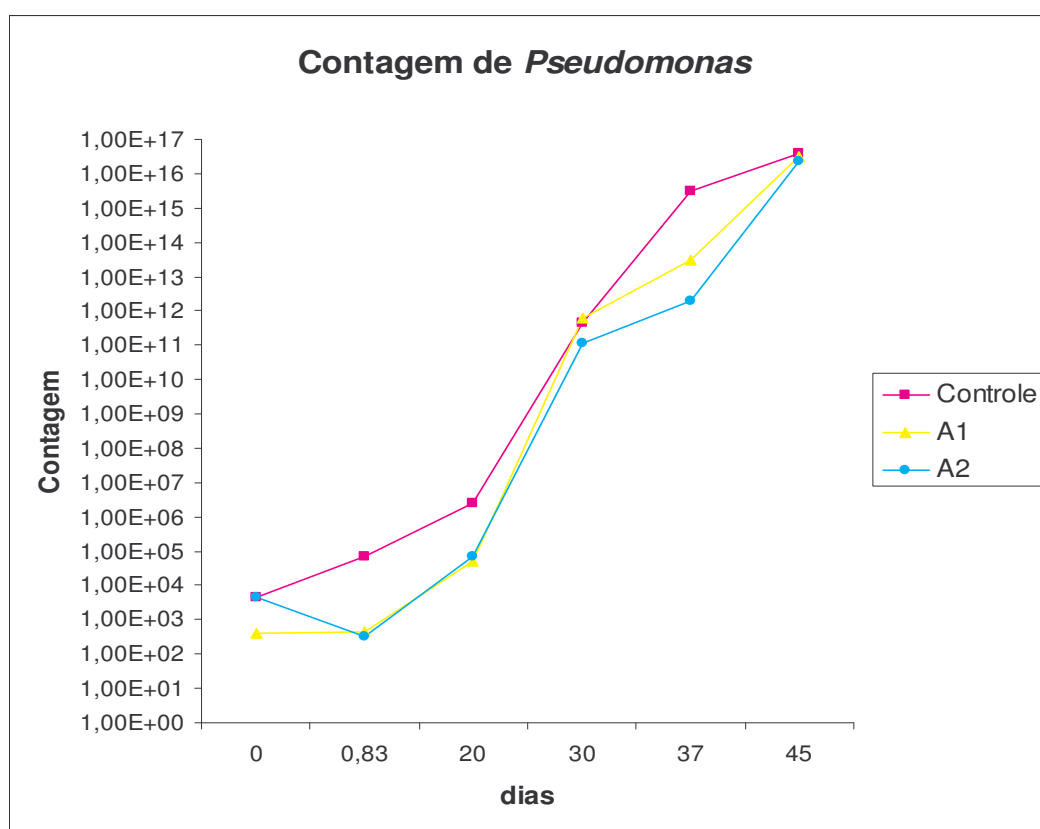


Figura 8. Gráfico da contagem de *Pseudomonas* sp. nas amostras A1 e A2 e controle durante 45 dias de armazenamento.

Em relação à contagem de *Pseudomonas* sp. em cortes de dianteiro bovino, pode-se observar que as amostras tratadas com vinagre após a desossa (A2) apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle. Nos tempos 20 horas e 20 dias de armazenamento, observou-se a redução de 2 ciclos logarítmicos do tratamento A2 comparado ao controle (C).

As amostras A1, A2 e C com 30 dias de armazenamento apresentaram contagens de *Pseudomonas* sp. superiores a 10^{11} UFC/g e não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre elas. Em 45 dias de armazenamento, não houve diferenças significativas entre as amostras (A1, A2 e C) para as contagens de bactérias mesófilas, psicrotróficas e *Pseudomonas* sp., sendo superior a 10^{15} UFC/g.

A Figura 9 mostra o comportamento de bactérias lácticas nas amostras tratadas com vinagre, A1 e A2 e no controle (C) durante os 45 dias de armazenamento.

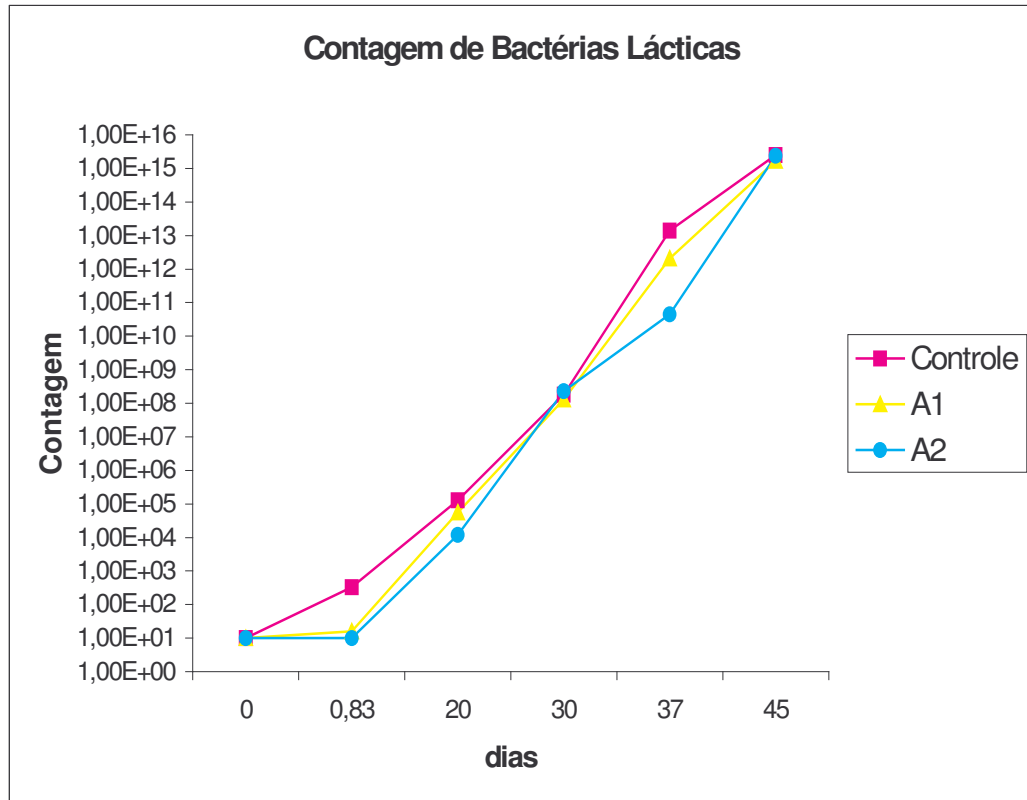


Figura 9. Gráfico da contagem de bactérias lácticas nas amostras durante 45 dias de armazenamento.

As contagens de bactérias lácticas foram menores que 10 UFC/g para todas as amostras, nos tempos D0H e D20h. Em 20 dias de armazenamento os cortes tratados com vinagre (A1 e A2) apresentaram a redução de 2 ciclos logarítmicos em relação ao controle. Em 30 dias de armazenamento não houve diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre as amostras.

As amostras foram acondicionadas a vácuo possibilitando um crescimento de bactérias lácticas que encontram condições favoráveis de oxigênio no meio para o seu desenvolvimento.

As figuras 10 e 11 mostram o comportamento dos bolores e leveduras nas amostras A1, A2 e controle durante os 45 dias de armazenamento.

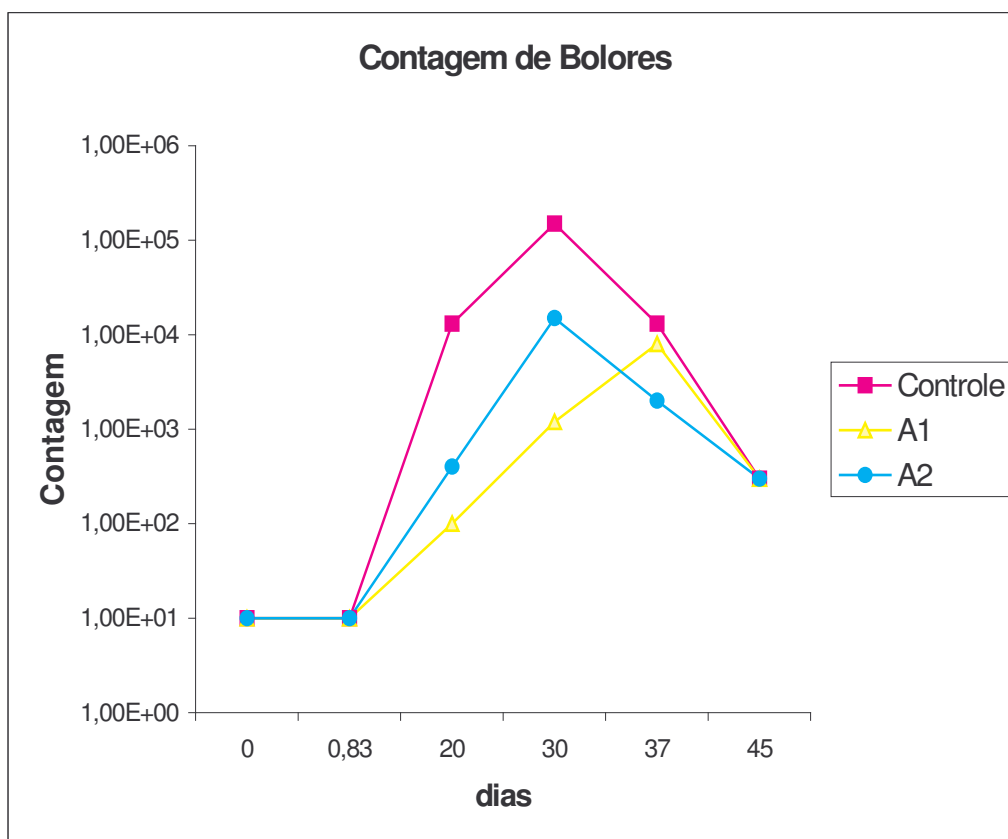


Figura 10. Gráfico da contagem de bolores nas amostras durante 45 dias de armazenamento.

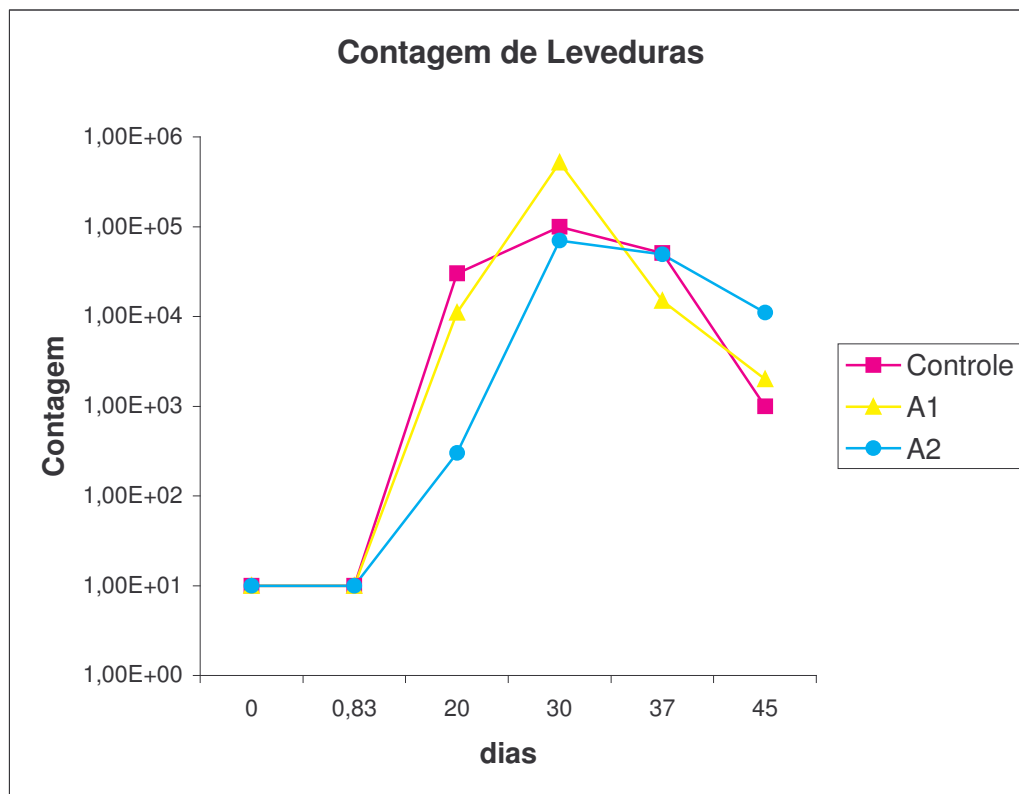


Figura 11. Gráfico da contagem de leveduras nas amostras durante o período de armazenamento.

A presença de bolores e leveduras em carnes *in natura* pode indicar más condições higiênico-sanitárias no abate e/ou manipulação da carcaça no ambiente frigorífico. Nos tempos 0 e 20 horas não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as amostras nas contagens de bolores e leveduras.

As amostras A1, A2 e C apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) em 20 e 30 dias de armazenamento. A contagem de bolores nas amostras A1 e A2 diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) do controle, mas foram iguais entre si. A contagem de leveduras apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos A1 e A2 e o controle.

No T20d observou-se uma redução de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos na contagem de bolores no tratamento A2 em relação às amostras não tratadas (C). Somente os cortes tratados com vinagre após a desossa (A1) estavam de acordo com o Código Sanitário (SP, 1992).

Observou-se que após 37 dias de armazenamento, ocorreu um decréscimo no crescimento de bolores e leveduras em todas as amostras. Em 45 dias de armazenamento, as amostras não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$).

Apesar de ter sido observado baixas contagens de leveduras nas carnes tratadas até o dia 20 de armazenamento, com 30 dias as carnes tratadas apresentaram contagem semelhante à carne não tratada. Este comportamento poderia ser atribuído a processos tais como, competição ou depleção de nutrientes entre microrganismos (ICMSF, 1980).

As figuras 12 e 13 mostram o comportamento das bactérias do grupo coliformes durante 45 dias de armazenamento.

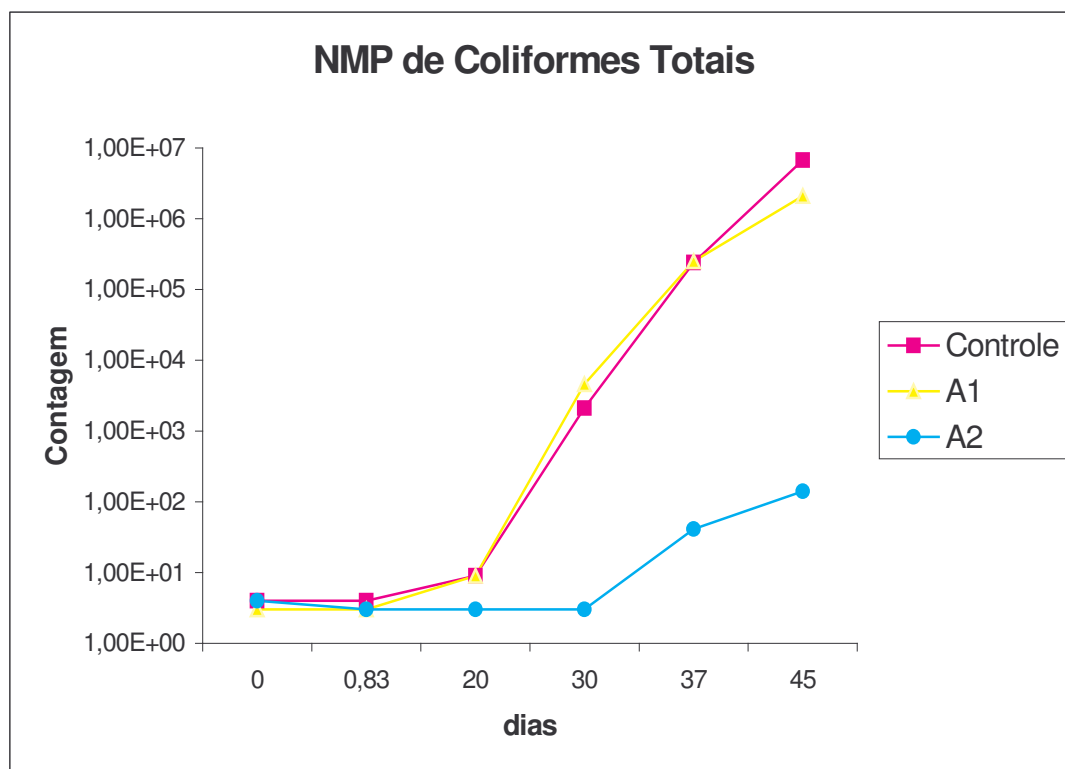


Figura 12. Gráfico do NMP de coliformes totais nas amostras durante 45 dias de armazenamento

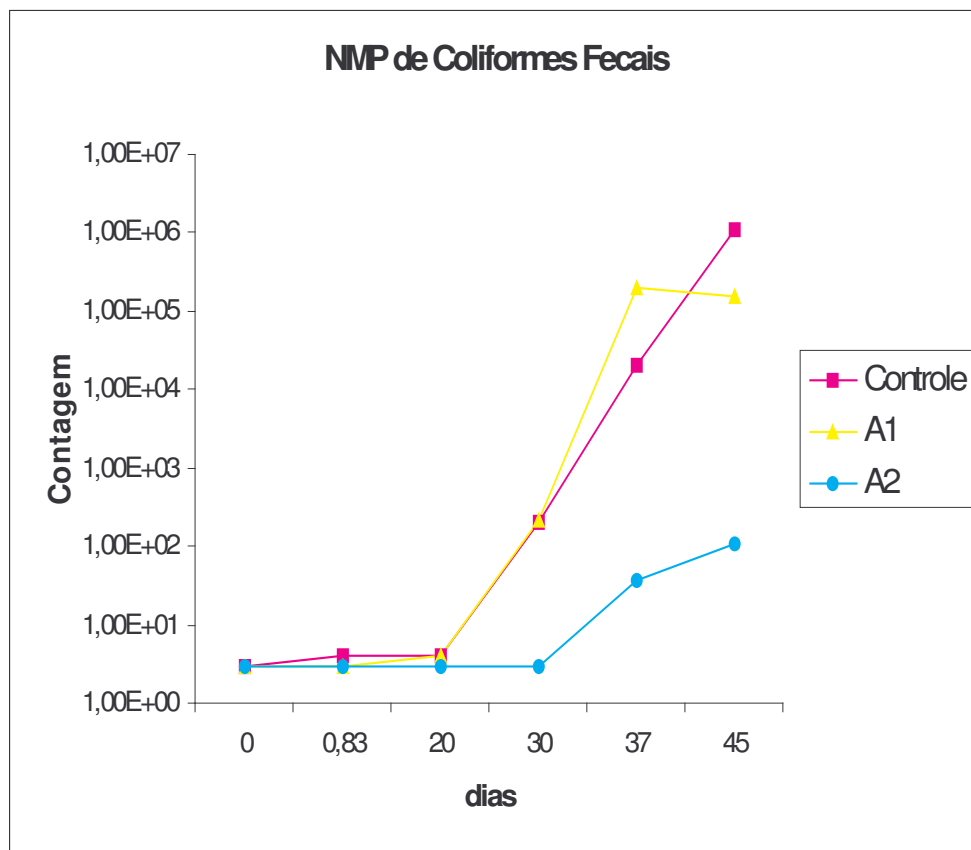


Figura 13. Gráfico do NMP de coliformes fecais nas amostras durante 45 dias de armazenamento.

O NMP de coliformes totais em 30, 37 e 45 dias de armazenamento mostrou diferença significativa ($P < 0,05$) entre as amostras tratadas e o controle. O tratamento A2 apresentou valores menores ($P < 0,05$) que o tratamento A1.

JAY & SHELEF (1978), estudaram as modificações microbiológicas em carnes estocadas em baixa temperatura e concluíram que as bactérias psicrotróficas são mesófilas capazes de produzir colônias visíveis, a uma temperatura de 0° a 7°C, no intervalo de 7 a 10 dias. Observou-se que após 20 dias de armazenamento as bactérias aeróbias mesófilas apresentaram um comportamento semelhante aos das bactérias psicrotróficas.

No presente trabalho, verificou-se que o vinagre mostrou inicialmente um decréscimo na contagem padrão em placa e comportamento similar foi encontrado por outros pesquisadores (FU *et al.*, 1994). Este efeito, porém, não continuou depois de 20 dias de estocagem das amostras embaladas a vácuo.

Segundo os autores GODDARD *et al.* (1996) e KOTULA & THELAPPURATE (1994), o efeito inibitório dos ácidos acético e láctico decresce com o tempo de estocagem.

SILVA & BERAQUET (1995) trabalhando com ácidos orgânicos na sanitização da carne bovina, observaram uma sensível redução de bolores e leveduras nos dias 7 e 9 de armazenamento nas amostras tratadas, comportamento similar ao encontrado neste estudo no dia 20 de armazenamento.

VASCONCELOS *et al.* (2002), constatou que nos dias 3 e 13 de armazenamento observaram menores ($P < 0,05$) níveis de psicrotróficas (1,3 e 3,5 ciclos logarítmicos, respectivamente) nas carnes tratadas com ácido acético 1%. Entretanto nos dias 23, 33 e 48 de estocagem, não foram verificadas diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Quando compara estes resultados com os encontrados na literatura (VASCONCELOS *et al.*, 2002), em que a contagem foi de 6 ciclos logarítmicos com pouco mais de 33 dias, na carne ovina, tratada com ácido acético 1% e, com aproximadamente 28 dias nas não tratadas, pode-se dizer que as condições higiênico-sanitárias do frigorífico avaliado no presente trabalho eram menos favoráveis. Apesar do vinagre apresentar um efeito positivo na preservação de carne é necessário que as Boas Práticas de Manipulação (BPM) sejam respeitadas para a produção de alimentos seguros.

A presença de coliformes indica condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. Os coliformes fecais fornecem informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre provável presença de patógenos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Os cortes de dianteiro bovino tratados com vinagre após a desossa (A2) mantiveram o valor de coliformes totais e fecais de acordo com o Código Sanitário (SP, 1992) até 45 dias de armazenamento.

O resultado deste trabalho está de acordo com ALMEIDA *et al.* (1993), que observaram a redução de bactérias do grupo coliformes em 2 ciclos logarítmicos na carne embalada a vácuo com o uso de soluções diluídas de ácido acético na carcaça de cordeiro pode reduzir, estendendo sua vida-de-prateleira de uma para quatro semanas.

VASCONCELOS *et al.* (2002), verificaram uma redução ($P < 0,05$) de coliformes fecais nas carnes tratadas com ácido acético 1% em relação às não tratadas, independente do tempo de maturação. Diferentemente, no trabalho de FU, SEBRANEK, MURRANO (1994), observou-se que o ácido acético foi eficiente inibindo os coliformes fecais apenas no dia zero de estocagem.

PUGA *et al.* (1999), avaliando o efeito do amaciamento da carne bovina embalada a vácuo, por 9 e 14 dias, observaram contagens de 10^4 UFC/g e $<10^3$ UFC/g para coliformes fecais, respectivamente, valores esses semelhantes aos encontrados neste estudo para as amostras A2 com 30 dias de armazenamento.

4.7 Análise dos atributos da carne

Foram avaliados a aparência geral, cor e odor dos cortes de dianteiro bovino embalados a vácuo tratados com vinagre (A1 e A2) e sem tratamento (C). As amostras A1 e C apresentaram aparências semelhantes, porém diferiram das amostras A2 que apresentaram aparência mais atrativa durante 45 dias de armazenamento.

Em 20 dias de armazenamento não observou diferença de coloração entre as amostras A1, A2 e controle após, aproximadamente, 20 minutos da retirada da embalagem (Figura 14).



Figura 14. Cortes de dianteiro tratados com vinagre (A2) e sem tratamento (C) com 20 dias de armazenamento.

Os cortes de dianteiro tratados com vinagre após a desossa (A2) e embalados a vácuo apresentaram coloração vermelha mais intensa e atrativa em relação ao controle em 20 dias de armazenamento (Figura 15). As amostras A1 e controle (C), embaladas a vácuo, apresentaram coloração semelhante.

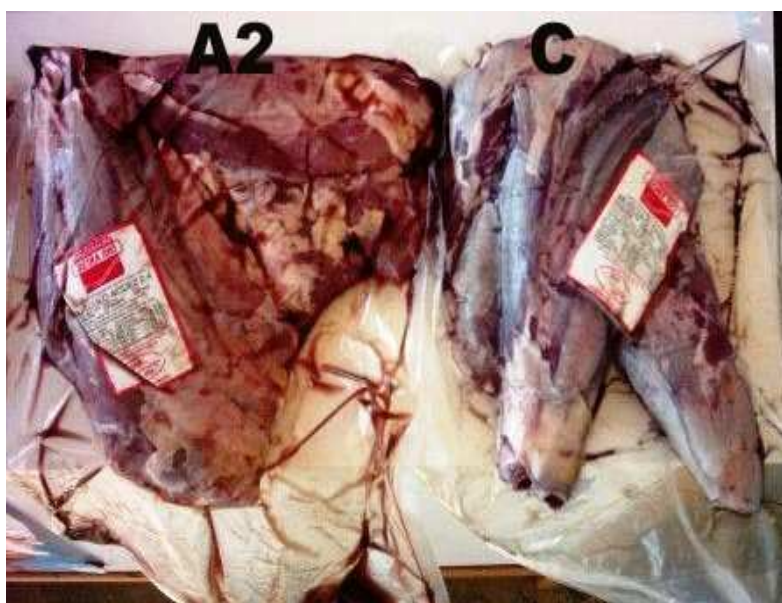


Figura 15. Cortes de dianteiro tratados com vinagre (A2) e sem tratamento (C) embalados a vácuo com 20 dias de armazenamento.

Os cortes de dianteiro tratados com vinagre após a desossa (A2) e embalados a vácuo apresentaram coloração vermelha mais intensa e atrativa em relação ao controle em 30 dias de armazenamento (Figura 16).



Figura 16. Cortes de dianteiro tratados com vinagre (A2) e sem tratamento (C) embalados a vácuo com 30 dias de armazenamento.

Após 30 dias de armazenamento, observou-se que as amostras A2 apresentaram uma maior exsudação em relação às amostras A1 e controle (C). Segundo RISTIC & OSTHOLD (1984), os tratamentos com ácidos causam queda do pH dos músculos, o que provoca maior exsudação.

6. CONCLUSÕES

No teste de CMI, os resultados obtidos indicaram que o teor de 2,1% (p/v) de acidez não foi suficiente para inibir o crescimento de uma linhagem isolada do meio PCA e uma do meio ABG. Os isolados do meio AP e MRS não cresceram nesta concentração. A concentração de 2,4% (p/v) foi a CMI para as linhagens isoladas de cortes de dianteiro bovino, no presente trabalho.

A vida-de-prateleira dos cortes de dianteiro bovino, com o tratamento A1 e controle (C), foi menor que 20 dias e as contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas atingiram valores próximos de 10^7 UFC/g. As contagens de bactérias mesófilas e psicrotróficas no tratamento A2 foram menores que 2 ciclos logarítmicos em relação ao controle (C) durante 37 dias de armazenamento.

O vinagre de álcool pode ser usado como conservante de carne *in natura* por não alterar as características sensoriais de cor, odor e aparência geral. A associação do uso de vinagre na concentração 2,1% (p/v) de acidez com a embalagem a vácuo resultou em diminuição na contagem microbiana e, conseqüentemente, em um aumento significativo da vida-de-prateleira da amostra do tratamento A2.

O tratamento A2 foi mais eficiente que o tratamento A1 em relação ao menor número de bactérias lácticas, bolores e leveduras até 20 dias de armazenamento.

Apesar de ter sido observado baixas contagens de bactérias lácticas, bolores e leveduras na amostra tratada com vinagre após a desossa (A2) até o dia 20 de armazenamento, com 37 dias a carne tratada apresentou contagem semelhante à carne não tratada. Observou-se que após 37 dias de armazenamento, ocorreu um decréscimo no crescimento de bolores e leveduras em todas as amostras.

A determinação de coliformes totais e fecais na amostra A2 foi menor que 10^2 NMP/g e nas amostras A1 e controle foi maior que 10^5 NMP/g durante os 45 dias de armazenamento. Portanto, o vinagre na concentração 2.4% de acidez possui a capacidade de inibir o crescimento de bactérias do grupo coliformes.

O tratamento com vinagre seguido de embalagem a vácuo e temperatura de armazenamento de $5\pm 2^\circ\text{C}$ inibe o crescimento de bactérias mesófilas, psicotróficas, *Pseudomonas* e de bolores e leveduras por 20 dias e o de bactérias do grupo coliformes por 45 dias de armazenamento, nos cortes de dianteiro bovino.

Os cortes de dianteiro bovino tratados com vinagre após a desossa (A2) apresentaram uma melhor aparência e cor em relação aos cortes tratados com vinagre após o abate (A1) e aos não tratados (C). As amostras A2 foram rejeitadas com 37 dias de armazenamento e as amostras A1 e C com 30 dias. A época de rejeição das amostras A2 esteve associada com o aparecimento de odores pútridos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C. A. Nutricines. **Food components in Health and Nutrition**. Nottingham. Nottingham Univ. Press, 1999.

ADAMS, M. R.; HALL, C. J. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. Int. **J. Food Science Technol.**, v. 23, n. 3, p. 297-301, 1988.

ALI, S. H.; HOSHYARE, D. F.; AL-DELAIFY, K. S. Microbiol counts on surfaces of lamb carcasses and shelf-life of refrigerated ground lamb. **Journal of Food Prot.**, v. 45, n.11, p.1013-1015, 1982.

ALMEIDA, P. F.; SILVA, E. N.; ALMEIDA, R. C. C. Contaminação e disseminação de carcaça de frangos em abatedouros. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n. 27, p. 12-17, 1993.

ALMEIDA, F. C. P. da S.; CARRARO, C. N. M.; ROSA, E. A. R. **Avaliação da eficácia de diferentes tratamentos sanitizantes em alimentos frescos**. In: Anais do XIII Seminário de Iniciação Científica da PUCPR, 2005.

ANDERSON, M. E.; MARSHALL, R. T.; STRINGER, W. C.; NAUMANN, H. D. Efficacies of three sanitizers under six conditions of application to surfaces of beef. **J. Food Science**, v. 42, n. 2, p. 326-329, 1977.

ANUALPEC. **ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA**. FNP. – Consultoria e Comércio. São Paulo. Ed. Argos. 2003. 442 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO (ABIA). **Compêndio da Legislação de Alimentos**. Consolidação das normas e padrões de alimentos, Atos do Ministério da Saúde. São Paulo: ABIA, 1989.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Bactérias coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em alimentos**: determinação do número mais provável NMP: mb-3463. Rio de Janeiro, 1991. 7 p.

BAIRD-PARKER, A. C. **Organic acids**. In: SILLIKER, J. H. **Microbiol ecology of foods**. New York, Academic, 1980. v. 1, p. 126-135.

BARRA, A. J.; PANETTA, J. C. **Valores de pH e número de microrganismos psicrotróficos em carne bovina**. Tese de Mestrado – Universidade Federal Fluminense Faculdade de Veterinária – CCM, Niterói – RJ, 1980. 66 p.

BARRAT, J.; McDOWELL, D.; OWENS, J. J.; MONTGOMERY, D. **Hygiene assessment by air sampling in a new and old abattoir**. Environ. Health, London, v. 91, n. 10, p. 274-276, 1983.

BAXTER, M.; ILLSTON, G. M. Psychrotrophic meat spoilage fungi within a freezing works. **N. Z. vet. J.**, v. 24, n. 8, p. 177-180, 1976.

BELINSON, J. L.; PRETORIUS, R. G.; ZHANG, W. H.; WU, L.Y.; QIAO, Y. L.; ELSON, P. Cervical cancer screening by simple visual inspection after acetic acid. **Obstt. Gynecol.**, v. 98, n. 3, p. 441-444, 2001.

BENASSATTI, H. E.; MARFIL, L. M.; OCCHIONERO, M. Ácido acético: sua aplicação desinfetante. **Acta Bioquim. Clin. Latinoam.**, v. 28, n. 3, p. 411-419, 1994.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 18 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1977. 991 p.

BRASIL. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040/61 referente às Normas Reguladoras de Emprego de Aditivos em Alimentos, alterado pelo Decreto nº 691/62. **Diário Oficial** (da República Federativa do Brasil), Rio de Janeiro, 09 de abril de 1965, retificado pelo de 20 de abril de 1965.

CANHOS, D. A. L.; DIAS E. L. **Tecnologia de carne bovina e produtos derivados**. Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia – FTPT, 1983.

CHESCA, A. C.; SILVA, N.; NAHAS, E.; NASCIMENTO, M. S. D. Efeito de diferentes sanitizantes sobre *Escherichia coli* O157:H7 artificialmente inoculada em alface. **In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Florianópolis, 2003.

CHICHISTER, D. F.; TANNER, F. W. Antimicrobial food additives, **In: Handbook of Food additives**. CRC Press, Cleaveland, 1972. 192 p.

CONNER, D. E.; KOTROLA, J. S. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 382-385, 1995.

CRONJE, H. S.; VANRENSBURG, E.; COOREMAN, B. F.; NIMAND, T.; BEYER, E. Speculoscopy versus the acetic acid test for cervical neplais. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, v. 69, n. 3, p. 249-253, 2000.

DELAZARI, I. **Microbiologia de carnes**. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, n. 52, p. 25-60, 1977.

DELMORE, G. L. R.; SOFOS, J. N.; SCHMITDT, G. R. Decontamination of inoculated beef with sequential spraying treatments. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, n. 5, p. 890-893, 1998.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. **J. Appl. Poult. Res.**, v. 11, p. 453-463, 2002.

DICKENS, J. A.; WHITEMORE, A. D. The effect of extended chilling times with acetic acid on the temperature and microbiological quality of processed poultry carcasses. **Poultry Science**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 1044-1048, 1995.

DICKSON, J. S. Acetic acid action on beef tissue surfaces contaminated with *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 2, p. 297-301, 1992.

DICKSON, J. S. Reduction of bacteria attached to meat surfaces by washing with selected compounds. **J. Food Prot.**, v. 51, n. 11, p. 869- 873, 1998.

DICKSON, J. S.; ANDERSON, M. E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: A review. **J. Food Prot.**, v. 55, n. 2, p. 133-140, 1992.

DICKSON, J. S.; SIRAGUSA, G. R. Survival of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* 0157: H7 and *Listeria monocytogenes* during storage on beef sanitized with organic acids. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 14, p. 313-327, 1994.

DRESSEL, J. & LEISTNER, L. Hemmung von Salmonellen bei Schachttierkoerpern von Haehnchen nach Genussauerebehandlung. **Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung**, Kulmbach, n. 185, p. 6040-6046, 1984.

EBNER, H. Vinegar: production of vinegar. In: PRESCOTT, S.C.; DUNN, C.G. **Industrial microbiology**, Westport: AVI, p. 803-833, 1983.

EBNER, H.; FOLLMANN, H. Acetic Acid. In: REHM, H.-J; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**, Weinheim: VCH, v. 3, p. 389-407, 1983.

EJECHI, B. O.; NWAFOR, O. E.; OKOKO, F. J. **Growth inhibition of tomato-rot fungi by phenolic acids and essential oil extracts of pepperfruit**. Food Research International, v. 32, p. 395-399, 1999.

FLISS, I.; SIMARD, R. E.; ETTRIKI, A. Comparison of three sampling techniques for microbiological analysis of meat surfaces. **J. Food Science**, Chicago, v. 56, n. 1, p. 249-251, 1991.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Ed. Atheneu, São Paulo, 1996.

FREDERICK, T. L.; MILLER, M. F.; THOMPSON, L. D.; RAMSEY, C. B. Microbiological properties of pork cheek meat as effected by acetic acid and temperature . **J. Food Science**, v. 59, n. 2, p. 300-302, 1994.

FU, A. H.; SEBRANEK, J. G.; MURRANO, E. A. Microbial and Quality Characteristics of Pork Cuts from Carcasses Treated with Sanitizing spray. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 2, p. 306-309, 1994.

GALVANE, J. O.; ROTELI-MARTINS, C. M.; TADINI, V. Achados da inspeção visual com ácido acético para rastreamento de câncer do colo uterino. **DST-J. Bras. Doenças Sex. Transm.** v. 14, n. 1, p. 43-45, 2002.

GILL, C. O.; NEWTON, K. G. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. **Meat Science**, v. 2, p. 207 – 217, 1978.

GODDARD, B. L., MIKEL, W. B., CONNER, D. E. Use of organic acids to improve the chemical, physical, and microbial attributes of beef strip loins stored at -1°C for 112 days. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v. 59, n. 8, p. 849-853, 1996.

GRAU, F. H. **Microbial ecology of meat and poultry**. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. **Advances in meat research. Meat and poultry microbiology**. Westport: AVI Publish., v. 2, p. 1-47, 1986.

HAMBY, P. L.; SAVELL, J. W.; ACUFF, G. R.; VANDERZANT, C.; CROSS, H. R. Spray-chilling an carcass decontamination systems using lactic and acetic acid. **Meat Science**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 1987.

HUFFMAN, R. D. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat, **Meat Science**, v. 62, p. 285-294, 2002.

ICMSF. International Commision on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). **Microbial ecology of foods. 1: Factors affecting life and death of microorganisms**. Academic Press. London. 1980. 259p.

INGRAM, M.; DAINITY, R. H. Changes caused by microbes in spoilage meats. **Journal Applied Microbiology**, London, v. 34, n. 1, p. 21-39, 1971.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 4^a ed., New York, AVI, p. 199-233, 1992.

JAY, J. M.; SHELEF, L. A. Microbial modifications in raw and processed meats and poultry at low temperatures. **Food Technology**, Chicago, v. 32, n. 5, p. 186-187, 1978.

JUNG, H. H.; CHO, S. D.; YOO, C. K.; LIM, H. H.; SHAE, S. W. Viniegra treatment in the management of granular myringitis. **J. Laryngol. Otol.**, v. 116, n. 3, p. 176-180, 2002.

KOTULA, K. L.; THELAPPURATE, R. Microbiological and sensory attributes of retail cuts of beef treated with acetic and lactic acid solutions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v. 57, n. 8. p. 665-670, 1994.

LILLARD, H. S.; BLANKENSHIP, L. C.; DICKENS, J. A.; CRAVEN, S. E.; SHACKELFORD, A. D. Effect of acetic acid on the microbiological quality of scald picked and unpicked broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 50, n. 2, p. 112-114, 1987.

LIMA, R. C. A.; MIRANDA, S. H. G.; GALLI, F. Febre aftosa: impacto sobre as exportações brasileiras de carnes e o contexto mundial das barreiras sanitárias. **Instituto de Estudos do Comércio e Negociações Internacionais (ICONE)**, 2005.

LUCK, E. **Conservación química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1981. 237p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock: biología de los microorganismos**. 8ª ed. Madrid: Prentice Hall Iberia, 1997.

MAEDA, A. H. **Estudo de bactérias acéticas de usina de açúcar e álcool**. Campinas, 1997. Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1997, 67 p.

MAREL, G. M.; VRIES, A. W.; LOGTESTEIN, J. G.; MOSSEL, D. A. A. Effect of lactic acid treatment and lactic acid content of fresh broiler chickens. **International Journal of Food Science and Technology**, London, Applied Science, 1982, p. 1-40.

NASCIMENTO, M. S. **Avaliação comparativa de tratamentos químicos na sanitização de frutas e verduras**. Araraquara, 2002. Dissertação (mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP.

NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. da P. L. M.; SILVA, K. C. Avaliação Comparativa de Diferentes Desinfetantes na Sanitização de Uva. **Braz. J. Food Technol.**, v. 6, n. 1, p. 63-68, 2003.

NETO, M. P. Embalagem da carne vermelha. **Revista Nacional da Carne**, Ano XXIX, n. 318, 2004.

NOTERMANS, S.; KAMPELMACHER, E. H. Attachment of bacteria in meat processing. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v. 63, n. 1, p. 72-78, 1983.

OKREND, A. J; JONHSTON, R. W.; MORAN, A. B. Effect of acetic acid on the death rates at 52°C of *Salmonella newport*, *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* in poultry scald water. **Jounal Food Protection**, Ames, v. 49, n. 7, p. 500-503, 1986.

OLIVEIRA, J. de; ANJOS, C. A. R.; BERAQUET, N. J. **Efeito da desossa a quente e da temperatura de condicionamento na qualidade microbiológica da carne bovina embalada a vácuo**. Campinas, 2003. Dissertação (mestrado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

OSTHOLD, W.; SHIN, H. K.; DRESSEL, J.; LEISTNER, L. Proving the storage life of carcasses by treating their surfaces with an acid spray. **Fleischwirtschaft**, v. 64, n. 7, p. 828-830, 1984.

PALUMBO, S. A. Is refrigeration enough to restrain foodborn pathogens? **Jounal of Food Protection**. v. 49, n. 12, p. 1003 -1009, 1986.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne: tecnologia da carne e de subprodutos**. Goiânia, CEGRAF – UFG, v. 2, p. 638-675, 1994.

PARIZOTTO, T. Bovinocultura à base de sementes. **Jornal da UEM**, p. 3, 2004.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAIN, E. C. S. **Microbiologia**. Trad. Manuel Adolpho May Pereira. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, v. 1, 1981.

PINEDA, N. R.; ALMEIDA, A. V. L. Mercado da carne bovina e o Serviço de Informação da Carne. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 317, 2003.

PODOLAK, R. K.; ZAYAS, J. F.; KASTNER, C. L.; FUNG, D. Y. C. Reduction of *Lysteria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella typhimurium* during storage on beef sanitized with fumaric, acet and lactic acids. International Congress of Meat Science and Technology, 4.1. **Proceedings**, San Antonio, American Meat Science Association, 1995, p. 299-300.

PORTO, E.; EIROA, M. N. E. Influência de diferentes tipos de vinagre e do suco de limão taiti na sobrevivência de *Vibrio cholerae* presente em filé de merluza. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Brasil, v. 27, n. 1/2, p. 1-6, 1998.

PORTO, E.; EIROA, M. N. E. Influência de diferentes tipos de vinagre e do hipoclorito de sódio na sobrevivência de *Vibrio cholerae* em folhas de alface (*Lactuca sativa*) artificialmente contaminadas e sobre microbiota natural. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Brasil, v. 26, n. 2, p. 199-207, 1996.

PRADO, I. N.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER J. V.; SOUZA N. E. Carne bovina brasileira: realidade e perspectivas. **Revista Nacional da Carne**. São Paulo, n. 326, 2004.

PRUDENCIO, S. H.; REDDY, K. V.; SANTOS, A. E. **Qualidade da carne bovina na cidade de Londrina – aspectos sensoriais, químicos e microbiológicos**. Londrina, 1985. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Londrina.

PUGA, D. M. U.; CONTRERAS, C. J. C; TURNBULL, M. R. Avaliação do amaciamento da carne bovina de dianterio (*Triceps brachi*) pelos métodos de maturação, estimulação elétrica, injeção de ácidos e tenderização mecânica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 88-96, 1999

QUEVEDO F.; LASTA, J. A.; DINELLI, J. A. Ccntrol Microbiologico de superficies con esponjas de poliuretano. **Rev. Latino-Amer. Micriobiol.**, v. 19, p. 79-82, 1977.

REVISTA NACIONAL DA CARNE. Carne Bovina brasileira: realidade e perspectivas. **Revista Nacional da Carne**. Ano XXIX, n. 342, 2005.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática**: roteiro e manual - bactérias e fungos. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993. 112 p.

RISTIC, M.; OSTHOLD, N. Einfluss der Sauereloesung auf die Lagerfaehigkeit von Broilern. **Mitteilungsblaatt der Bundesanstalt für Fleischforschung**, Kulnmbach, n. 86, p. 6193-6198, 1984.

ROCHA, E. S.; DAREZZO, H. M.; GOMES, C. A. O.; CORTES, M. V. C. B. Eficiência de diferentes sanitizantes na redução da contaminação microbiana em alface americana minimamente processada. **In**: Anais do Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000. p. 4152.

ROÇA, R. O.; SERRANO, A. M. **Influência do banho de aspersão “ante-mortem” em parâmetros bioquímicos e microbianos da carne bovina**. Campinas, 1993. Tese de Doutorado, Unicamp, 185 p.

ROÇA, R. O., SERRANO, A. M. Abate de bovinos: alterações microbianas da carcaça. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 35, p. 8-13, 1995.

SÃO PAULO. Secretaria da saúde. **Código Sanitário**. Decreto nº 12.342 de 27 de setembro de 1978. 5ª ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado – IMESP, 1992, 412 p.

SARANTOPOULOS, C. I. G. L.; CONTRERA, C. J. C.; ALVES, R. M. V.; ARIMA, H.; GOMES, T. C. Estabilidade de Carne Bovina em Atmosfera Modificada após Maturação em Embalagem a Vácuo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, ITAL - Campinas-SP, v. 26, n. 2, p. 143-154, 1996.

SAUCIER, L. **Meat safety: challenges for the future nutrition abstracts and reviews**. (Series A), p. 705-709, 1999.

SILLIKER J. H.; GABIS, D. A. **Salmonella** In: PEARSON .M.; DUTSON, R. T. **Advances in meat research**, Westport, Avi, 1986. p. 209 -229.

SILVA, J. A. **Extensão da vida de prateleira da carne bovina pela utilização de sanitizantes físicos e químicos**. Tese (Doutor), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, São Paulo, 1995. 119 p.

SILVA, J. A. Emprego de ácidos orgânicos como sanitizantes da carcaça bovina logo depois do abate. **Higiene Alimentar**, São Paulo-SP, v. 10, n. 45, p. 48-51, 1996.

SILVA, J. A. Sanitização da carne com ácidos orgânicos. Parte I. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 60, p.55-62, 1999a.

SILVA, J. A. Sanitização da carne com ácidos orgânicos. Parte II. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 62, p. 37-43, 1999b.

SILVA J. A. & BERAQUET, N. J. **Extension of meat shelf life by acid spraying of carcasses**. In: International Congress of Meat Science and Technology, 42. Lillehamer, Set. 1-6, 1996. Proceedings, v. 2, p. 174-175, 1996.

SILVA, J. A., BERAQUET, N. J. Redução da contaminação inicial de carne bovina pela sanitização com ácidos orgânicos. **B. CEPPA**. Curitiba, v. 15, n. 2, p. 127-142, 1997.

SILVA, J. A., SOARES, L. F., COSTA, E. L. Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão. **Revista TeC. Carnes** - Campinas, SP, v. 3, n.1, p. 19-26, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997.

SMITH, F. C., ADAMS, J. C., FIELD, R. A. Predominant psychrotrophic bacteria on fresh and aged ground beef and antelope. **J. Milk Food Technol.**, v. 38, n. 9, p. 516-7, 1975.

SMULDERS, F. J. M.; BARENDSEN, P.; LOGTESTIJN, J. C.; MOSSEL, D. A. A.; MAREL, G. M. Lactic acid: considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant. **Journal of Food Technology**, London, v. 21, n. 4, p. 419-436, 1986.

SOARES, A. L., ODA, S. H. I., LARA, J. A. F. de, YAMASHITA, F., IDA, E. I., SHIMOKOMAKI, M. Ingredientes e Aditivos para Carnes: Segurança e Inovação. **Revista Nacional da Carne**. São Paulo, v. 27, n. 317, p. 24-32, 2003.

SOARES, E. A. **Inibição de *Botrytis cinerea* em uva cv. Itália utilizando formulação de anti-fúngico derivado de *Bacillus subtilis***. Londrina. Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos), 2002. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina.

SOARES, L. F. **Utilização de Ácidos Orgânicos na Redução da Carga Microbiana de Carcaças de Frango.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), 1997. Universidade Estadual de Paraíba.

SOCOL, M. C. H. **Otimização da Vida Útil da Tilápia Cultivada (*Oreochromis niloticus*) Minimamente Processada e Armazenada Sob Refrigeração.** Dissertação (mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2002. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 124 p.

STOKES, J. L.; REDMOND, M. L. **Microorganism in food.** 1 – Their significance and methods of enumeration. Toronto, University of Toronto Press, 1975, p. 23-31.

TECNOLOGIA. **Método aumenta vida útil da carne. Sistema natural de conservação de produto rende prêmio a pesquisador da UFSM.** Zero Hora: Campo e Lavoura, 1998.

THORP, N. A.; KRUGER, J.; OLIVER, T. S. The antibacterial activity of acetic acid and Burrow's solution as topical otological preparations. **J. Laryngol. Otolology**, v. 112, p. 925-928, 1998.

UTYAMA, I. K. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica in vitro do vinagre a ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas.** Riberão Preto. Dissertação (mestrado) Escola de Enfermagem de Riberão Preto, 2003. Universidade de São Paulo.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER D. F. **Compendium of methods microbiological for the examination of foods.** 3.ed. Washington: American Public Health Association - APHA, 1992. 1219 p.

VARNAM, A. H. & SUTHERLAND, J. P. **Meat and Meat Products Technology, Chemistry and Microbiology**. London: Chapman & Hall, 1995 (Food Product Series). 430 p.

VASCONCELOS, E. C., ZAPATA, J. F. F., FIGUEIREDO E. A., CASTELO BRANCO, M. A. A., BORGES, A. S. A microbiota da carcaça e da carne ovina tratada com ácido acético, embalada a vácuo e maturada por 48 dias. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22, n. 3, 2002.

VIEIRA, G. A. Desafios e perspectivas da cadeia produtiva da carne bovina no Brasil. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 329, 2004.

XAVIER, C.V.A. **Métodos químicos e físicos para o prolongamento da carne de frango refrigerada**. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1997, 126 p.

YANO, D.M.Y.; VALARINI, P.J. Métodos de Identificação de Bactérias. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 369-390, 1998.